# ใบรับรองวิทยานิพนธ์

## บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

**ปริญญา**

จุลชีววิทยา | จุลชีววิทยา

**สาขา** | **ภาควิชา**

**เรื่อง** การโคลนยีน และการแสดงออกของโปรตีนผิวของไวรัสตับอักเสบบีใน Mammalian cell line

Gene Cloning and Expression of Hepatitis B Surface Antigen in Mammalian cell line

**นามผู้วิจัย** นางสาวภัทรกันย์ มีศิริ

**ได้พิจารณาเห็นชอบโดย**

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก** .....

( รองศาสตราจารย์ ร้อยเอก ชัยวัฒน์ กิตติกูล, วท.ม. )

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม** .....

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์อิงอร กิมกง, วท.ด. )

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม** .....

( อาจารย์ปนัดดา เทพอัคศร, ปร.ด. )

**หัวหน้าภาควิชา** .....

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทนา สีสุข, Ph.D. )

**บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว**

.....

( รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr. )

**คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย**

**วันที่** ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

# การโคลนยีน และการแสดงออกของโปรตีนผิวของไวรัสตับอักเสบบีใน Mammalian cell line

# Gene Cloning and Expression of Hepatitis B Surface Antigen in Mammalian cell line


โดย

นางสาวภัทรกันย์ มีศิริ


เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
พ.ศ. 2558


ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภัทรกันย์ มีศิริ 2558: การโคลนยีน และการแสดงออกของโปรตีนผิวของไวรัสตับอักเสบบีใน Mammalian cell line ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ร้อยเอก ชัยวัฒน์ กิตติกูล, วท.ม. 83 หน้า

การผลิตโปรตีนบนผิวของไวรัสตับอักเสบบี (hepatitis B surface antigen, HBsAg) ชนิด middle protein และ small protein โดยทำยีนโคลนนิ่งเพิ่มปริมาณยีน *PreS2 + S* และ ยีน *S* จากพลาสมิดที่มียีน HBsAg อยู่โดยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส และใช้ไพร์เมอร์ที่มี secretory signal sequence ได้ยีน *PreS2+S* มีขนาด 984 คู่เบส และยีน *S* มีขนาด 819 คู่เบสนำดีเอ็นเอที่ได้ไปเชื่อมต่อกับ expression vector (pcDNA3.4) ได้พลาสมิดลูกผสม pcDNA3.4/*PreS2+S* และ pcDNA3.4/*S* และนำเข้าสู่ mammalian cell line โดย transfection ผลตรวจการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีนด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ immunofluorescence assay (IFA) สามารถตรวจพบ middle protein ในเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์หลังการ transfection แล้ว 24 ชั่วโมง ส่วน small protein สามารถตรวจพบได้ช้ากว่าคือตรวจพบได้ในเซลล์และน้ำเลี้ยงเซลล์หลังการ transfection แล้ว 48 ชั่วโมง และพบมี HBsAg เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆจนถึง 72 ชั่วโมงผลการตรวจวิเคราะห์โดย Western blot ตรวจพบ middle protein ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับ anti-HBsAg polyclonal antibody ดังนั้นมีความเป็นไปได้ที่จะนำโปรตีนของไวรัสตับอักเสบบีที่ผลิตได้นี้ไปใช้ในการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยทางภูมิคุ้มกันหรือพัฒนาวัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบีต่อไป

_____ _____ ___/___/___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Puttarakun Meesiri 2015: Gene Cloning and Expression of Hepatitis B Surface Antigen in Mammalian cell line. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Associate Professor Captain Chaivat Kittigul, M.Sc. 83 pages.

Middle protein and small protein of hepatitis B surface antigen (HBsAg) were produced by gene cloning and expression in mammalian cell line. PCR amplification of *PreS2+S* and *S* genes from plasmids containing HBsAg genes were performent using primers with have secretory signal sequence and gave DNA 984 bp and 819 bp, respectively. Middle protein HBsAg DNA (984 bp) and small protein HBsAg DNA (819 bp) were inserted into the expression vector (pcDNA3.4) recombinant plasmid of pcDNA3.4/*PreS2+S* and pcDNA3.4/*S* were obtained, then,the recombinant plasmids were transfected into mammalian cell line and tested for HBsAg expression by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunofluorescence assay (IFA). The middle proteincould be detected intracellular and in cell culture fluid 24 hours earlier than the small protein at 48 hours after transfection. The level of HBsAg expression increased until 72 hours aftert ransfection. Western blot analysis of HBsAg reacted with anti-HBsAg polyclonal antibody showed specificity to the middle protein. This HBsAg may be useful for the development of diagnostic test and vaccine development of hepatitis B.

_____ _____ ___/___/___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

# กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์รองศาสตราจารย์ ร้อยเอก ชัยวัฒน์ กิตติกูล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อิงอร กิมกงกรรมการที่ปรึกษาสาขาวิชาเอก และ ดร. ปนัดดา เทพอัคศร กรรมการที่ปรึกษาสาขาวิชารอง ที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ นายอภิชัย ประชาสุภาพ และนางสาวพรทิพย์ เชื้อแพ่ง นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่ให้การสนับสนุน และให้คำปรึกษาในการศึกษาค้นคว้าและวิจัยขั้นปริญญาโท

ขอกราบขอบพระคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือและห้องปฏิบัติการ

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และอาจารย์ทุกท่านที่ให้กำลังใจและสนับสนุนการศึกษาของข้าพเจ้าจนประสพความสำเร็จ และขอบคุณพี่ๆ เพื่อน และน้องๆทุกท่านของศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ที่ช่วยเหลือและสนับสนุนช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ ที่ได้อบรมและให้กำลังใจผู้วิจัยมาตลอดในทุกเรื่อง

ภัทรกันย์ มีศิริ

พฤศจิกายน 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

# สารบัญ

หน้า


| | |
|---|---|
| สารบัญ | (1) |
| สารบัญตาราง | (2) |
| สารบัญภาพ | (3) |
| คำนำ | 1 |
| วัตถุประสงค์ | 3 |
| การตรวจเอกสาร | 4 |
| อุปกรณ์และวิธีการ | 22 |
| อุปกรณ์ | 22 |
| วิธีการ | 26 |
| ผลและวิจารณ์ | 50 |
| ผล | 50 |
| วิจารณ์ | 67 |
| สรุปผลการทดลอง | 69 |
| เอกสารและสิ่งอ้างอิง | 70 |
| ภาคผนวก | 74 |
| ประวัติการศึกษาและการทำงาน | 83 |


ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | ส่วนประกอบและหน้าที่ของเวคเตอร์ pcDNA3.4™ | 20 |
| 2 | ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการ transfectionโดยใช้พลาสมิดลูกผสมที่มียีน *PreS2+S* จากน้ำเลี้ยงเซลล์ Expi293F™ cell โดยวิธี ELISA | 57 |
| 3 | ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการ transfectionโดยใช้พลาสมิดลูกผสมที่มียีน *S* จากน้ำเลี้ยงเซลล์ Expi293F™ cell โดยวิธี ELISA | 59 |
| 4 | ผลการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี ELISA หลังการ transfectionที่ชั่วโมงต่างๆ | 61 |


ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

# สารบัญภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | ลักษณะจีโนมของไวรัสตับอักเสบบี | 5 |
| 2 | โปรตีนที่สร้างจาก *S* ORF | 7 |
| 3 | Markers และลักษณะที่พบในผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบบี | 12 |
| 4 | แผนภูมิส่วนประกอบต่างๆของเวคเตอร์ pcDNA$^{TM}$3.4 | 19 |
| 5 | แผนผังวิธีการสร้างพลาสมิดลูดผสมที่มียีน *PreS2+S* | 26 |
| 6 | แผนผังวิธีการสร้างพลาสมิดลูดผสมที่มียีน *S* | 27 |
| 7 | ผลการเพิ่มปริมาณยีน *PreS2+S* | 50 |
| 8 | ผลการเพิ่มปริมาณยีน *S* | 51 |
| 9 | ผลการคัดเลือกพลาสมิดลูกผสม pcDNA3.4 ที่มียีน *PreS2+S* โดยวิธี colony PCR | 52 |
| 10 | ผลการคัดเลือกพลาสมิดลูกผสม pcDNA3.4 ที่มียีน *S* โดยวิธี colony PCR | 53 |
| 11 | ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวลีโอไทด์ของ pcDNA3.4/*PreS2+S* โคลน 4 กับฐานข้อมูล NCBI | 54 |
| 12 | ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวลีโอไทด์ของ pcDNA3.4/*S* โคลน 2 กับฐานข้อมูลNCBI | 55 |
| 13 | แสดงลักษณะเซลล์Expi293F$^{TM}$cell ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ | 56 |
| 14 | ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการ transfection โดยใช้พลาสมิดลูกผสมที่มียีน *PreS2+S* จากน้ำเลี้ยงเซลล์ Expi293F$^{TM}$cell โดยวิธีELISA | 58 |
| 15 | ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการ transfection โดยใช้พลาสมิดลูกผสมที่มียีน *S* จากน้ำเลี้ยงเซลล์ Expi293F$^{TM}$cell โดยวิธีELISA | 59 |
| 16 | ผลการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี ELISA หลังการ transfection ที่ชั่วโมงต่างๆ | 61 |
| 17 | ผลการตรวจสอบการแสดงออกของ middle protein ด้วยวิธี IFA หลังการ transfectionที่ชั่วโมงต่างๆ | 63 |
| 18 | ผลการตรวจสอบการแสดงออกของ small protein ด้วยวิธี IFA หลังการ transfectionที่ชั่วโมงต่าง | 64 |


ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

# สารบัญภาพ (ต่อ)


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 19 | การแยกขนาดและตรวจสอบความจำเพาะของโปรตีน | 65 |


ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

# การโคลนยีน และการแสดงออกของโปรตีนผิวของไวรัสตับอักเสบบีใน Mammalian cell line

# Gene Cloning and Expression of Hepatitis B Surface Antigen in Mammalian cell line

## คำนำ

โรคตับอักเสบที่เกิดจากไวรัสตับอักเสบบี (Hepatitis B virus) เป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุข ทุกประเทศทั่วโลกให้ความสนใจในการควบคุมและป้องกัน เนื่องจากเป็นสาเหตุให้เกิดโรคตับแข็งและโรคมะเร็งตับ พบว่ามีผู้เสียชีวิตจากการติดไวรัสตับอักเสบบีปีละประมาณ 1 ล้านคน จากรายงานของกรมควบคุมโรคในปีพ.ศ. 2556 พบว่าคนไทยเป็นพาหะของโรคนี้ประมาณร้อยละ 10-15 ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าไวรัสตับอักเสบบี (HBV) เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคตับในมนุษย์ได้แก่ตับอักเสบแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง (acute and chronic hepatitis) ซึ่งทำให้ตับมีการเปลี่ยนแปลงผลที่ตามมาคือโรคตับแข็ง (cirrhosis) และโรคมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma) โดยแอนติเจนบนผิวของไวรัสตับอักเสบบี (HBsAgหรือ HBs protein) ประกอบด้วยโปรตีน 3 ชนิด คือ Large Hepatitis B surface protein (LHBs) หรือโปรตีน PreS1 สร้างจากยีน *PreS1+ PreS2+S*, Middle Hepatitis B surface protein (MHBs) หรือโปรตีน PreS2 สร้างจากยีน*PreS2+S* และ Small Hepatitis B surface protein (SHBs) หรือโปรตีน S สร้างจากยีน *S* ซึ่งยีน*S* เป็นยีนที่สร้าง HBsAg ขนาด P25 และ GP28 ยีน *PreS2+ S* เป็นยีนที่สร้าง HBsAg ขนาด GP33 และ GP36 และยีน *PreS1+ PreS2+ S* เป็นยีนที่สร้าง HBsAg ขนาด P43 และ GP46 โปรตีน PreS2 ประกอบด้วย 281 กรดอะมิโนมีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 1-55 จากยีน *PreS2* และตำแหน่งที่ 56-281 จากยีน *S* ลำดับกรดอะมิโนส่วนที่สร้างจากยีน *PreS2* มีตำแหน่งที่ใช้จับ (binding site) กับ polymerized human serum albumin (pHSA) ซึ่งมี determinant สำหรับจับกับ receptor ของเซลล์ตับซึ่งเกี่ยวข้องกับการเข้าสู่เซลล์ตับของไวรัสตับอักเสบบี นอกจากนี้ลำดับกรดอะมิโนส่วนที่สร้างจากยีน *PreS2* ยังทำให้เกิด hydrophilic amino acids และ antigenic epitope บนผิวของไวรัส และพบว่าโปรตีน PreS2 มี antigenicity ที่มากกว่า antigenic epitope ที่พบในลำดับกรดอะมิโนที่สร้างจากยีน *S* และมี strong

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

antigenic determinants สำหรับ T cells และ B cells ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มสมบัติการเป็นแอนติเจนของระบบภูมิคุ้มกัน (enhance immunogenicity) ที่ช่วยในการกำจัดไวรัสและป้องกันไวรัสเข้าสู่เซลล์ตับ (Guo*et al,* 2009)

ดังนั้น HBsAg จึงเป็นโปรตีนที่น่าสนใจสำหรับนำไปใช้ในการผลิตวัคซีนหรือใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตน้ำยาชุดตรวจวินิจฉัยทางภูมิคุ้มกันการศึกษานี้ได้ทำยีนโคลนนิ่งเพื่อสร้าง HBsAgได้แก่ middle proteinและsmall proteinใน mammalian cell เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

# วัตถุประสงค์

เพื่อสร้างและผลิต HBsAg ชนิด middle protein และ small protein ของเชื้อไวรัสตับอักเสบี เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสตับอับเสบบีและการพัฒนาวัคซีนต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

# การตรวจเอกสาร

## 1. ไวรัสตับอักเสบบี

ไวรัสตับอักเสบบีถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1965 โดย Dr. Blumberg และคณะได้ค้นพบออสเตรเลียแอนติเจน (Australia antigen) ต่อมาเปลี่ยนชื่อเป็น Hepatitis B surface antigen จนกระทั่งปี ค.ศ.1985 คณะกรรมการจัดจำแนกและตั้งชื่อไวรัส (International Committee on Taxonomy of Viruses) ได้จัดจำแนกไวรัสนี้ไว้ใน family Hepadnaviridae มีความหมายว่ากลุ่มไวรัสที่มีจีโนม (genome) เป็นดีเอ็นเอ (DNA) และสามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์ตับ (Arnold, 1992)

### 1.1 ลักษณะอนุภาคของไวรัสตับอักเสบบี

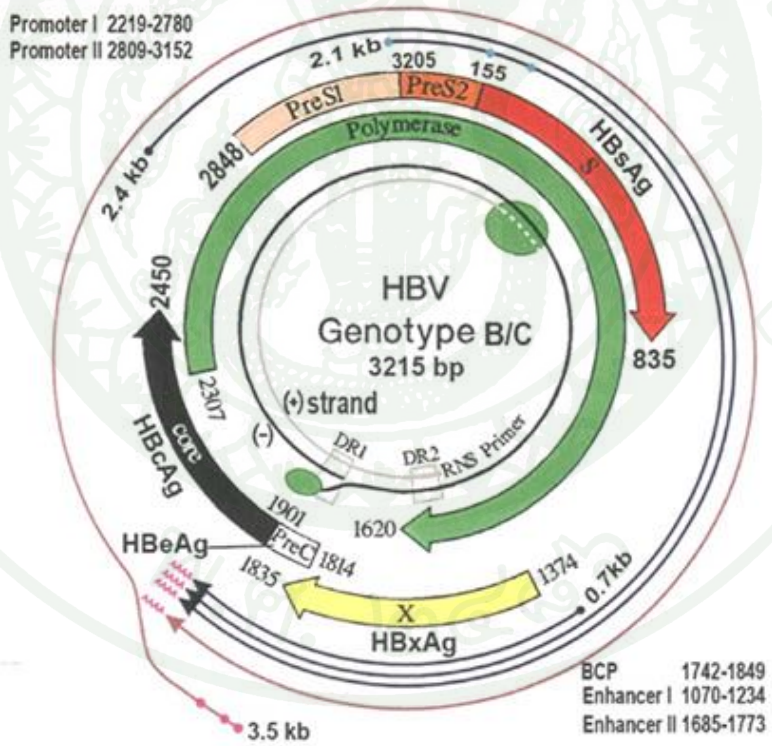
เมื่อนำซีรั่มผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบบีมาสกัดแยกไวรัส และศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนจะพบไวรัสมีรูปร่าง 3 รูปแบบ คือ Dane particle รูปทรงกลมมีขนาด 42 nm เป็นไวรัสที่สมบูรณ์ (complete virion) มีnucleo-capsid ซึ่งประกอบด้วย circular DNA ขนาด 3.2 Kb, DNA polymerase, protein kinase, DNA-linked protein และ capsid ซึ่งเป็นส่วนที่มี Hepatitis B core antigen (HBcAg) และมี envelope หุ้มอีกชั้นหนึ่ง บน envelope เป็นส่วนที่มี Hepatitis B surface antigen (HBsAg) จึงเป็นอนุภาคไวรัสที่มี infectivity รูปแบบที่สองเป็นรูปทรงกลม (Sphere) ขนาด 15-25 nm และรูปแบบที่สามเป็นอนุภาครูปแท่ง (Tubule) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 nm แต่ยาว 50-230 nm อนุภาคสองรูปแบบหลังนี้มีเฉพาะ HBsAg จึงเป็น non infectious particle

นอกจากนี้ยังพบแอนติเจนชนิดที่สามอยู่ในส่วนที่เป็นสารละลายซีรั่มของผู้ป่วย แอนติเจนชนิดนี้เรียกว่า Hepatitis B e antigen (HBeAg) (Robinson, 1985; ชโลบล, 2536)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2 ลักษณะโครงสร้างทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสตับอักเสบบี

ไวรัสตับอักเสบบี (HBV) มีสารพันธุกรรมเป็นชนิด DNA สายคู่ รูปร่างกลม (Double Stranded DNA) มีความยาวประมาณ 3,200 คู่เบส การจัดเรียงตัวของยีนประกอบด้วย open reading frame ซ้อนทับกันอยู่ (overlapping ORF) คือ *S, C, P* และ *X* โดยที่ *S* ORF ใช้ในการสร้าง surface protein (HBsAg), *C* ORF ใช้ในการสร้าง nucleocapsid protein หรือ core protein (HBsAgและ HBeAg), *P* ORF ใช้ในการสร้างเอนไซม์ DNA polymerase/reverse transcriptase และ *X* ORF ใช้ในการสร้าง Hepatitis B X protein (HBX) (ศิริฤกษ์, 2543) ซึ่งจะแปลรหัสเป็น mRNA เพื่อสร้างโปรตีน




**ภาพที่ 1** ลักษณะจีโนมของไวรัสตับอักเสบบี

**ที่มา:** Zhang and Guangwen (2011)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3 ยีนและโปรตีนของเชื้อไวรัสตับอับเสบบี

จีโนมของไวรัสตับอักเสบบีประกอบด้วยยีนที่สำคัญ 4 ส่วน คือ

*S gene* ประกอบไปด้วย *S, pre S1* และ *pre S2* ทำหน้าที่ในการสร้างโปรตีนของ envelope

*C* gene ควบคุมการสร้าง Hepatitis B core antigen (HBcAg) ซึ่งจะทำให้เกิด nucleocapsid และ Hepatitis B e antigen (HBeAg) ที่บ่งบอกการติดเชื้อของไวรัสระยะที่แบ่งตัวเพิ่มจำนวนอยู่

*P* gene จะ code โปรตีนในการสร้างเอนไซม์ polymerase ในขบวนการ replication

*X* gene จะ code โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของไวรัส

โปรตีนในส่วน envelope ของไวรัสตับอับเสบบีพบว่ามีอยู่ 3 ชนิด คือ Major หรือ small protein (S) มี 226 กรดอะมิโน ถูกควบคุมการสร้างโดยยีน *S* ชนิดที่สอง middle protein (M) มีกรดอะมิโนเพิ่มขึ้นอีก 55 กรดอะมิโน และถูกควบคุมโดยยีน *pre S2* ชนิดที่สาม Large protein (L) มีกรดอะมิโนเพิ่มขึ้นอีก 108 กรดอะมิโนและถูกควบคุมโดยยีน *pre S1*

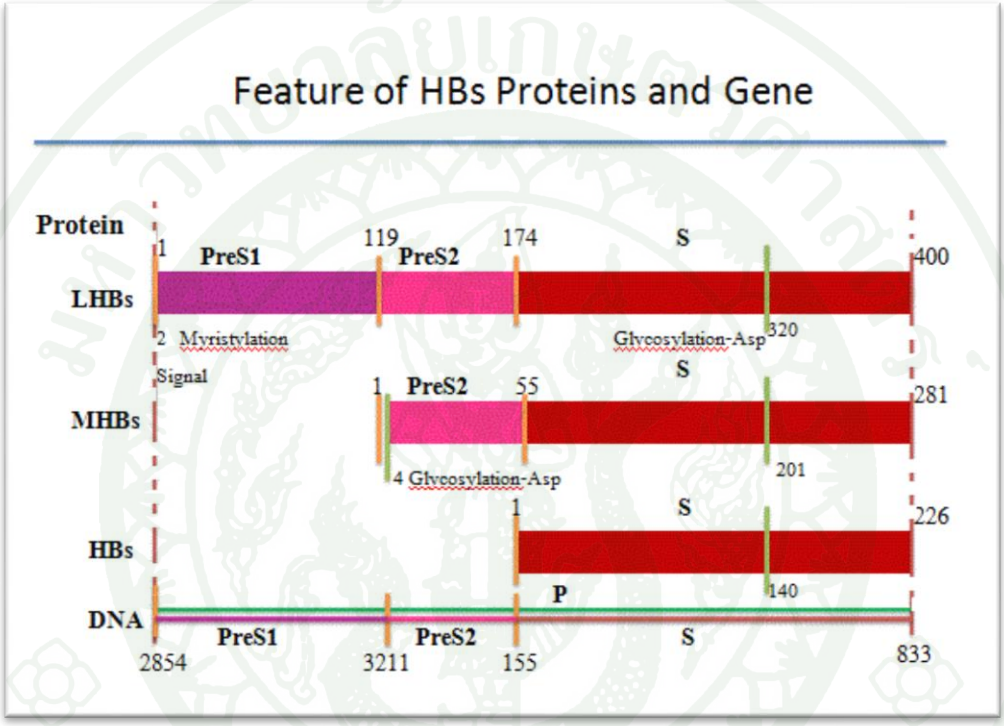
Major protein (major HBsAg) มี 2 รูปแบบ คือ non glycosylated form มีน้ำหนักโมเลกุล 24 กิโลดาลตัน (P24) และ glycosylated form มีน้ำหนักโมเลกุล 27 กิโลดาลตัน (GP27)

Middle protein สร้างมาจากยีน *pre S2* และ *S* ประกอบด้วย 281 กรดอะมิโน เป็นส่วนประกอบของ envelope antigen ซึ่งมีโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 2 แบบ คือ 33 กิโลดาลตัน (GP33) และ 36 กิโลดาลตัน (GP36) ในส่วน *Pre S* พบว่ามีส่วน receptor เพื่อจับกับ polymerized human serum albumin ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเข้าสู่เซลล์ตับของไวรัสตับอักเสบบี

Large protein (large HBsAg) สร้างมาจากยีน *pre S1, pre S2* และ *S* gene ประกอบด้วย 389 กรดอะมิโนมีโปรตีนที่แตกต่างกัน 2 รูปแบบ คือ non glycosylated มีน้ำหนักโมเลกุล 39 กิโลดาลตัน (P39) และ glycosylated มีน้ำหนักโมเลกุล 42 กิโลดาลตัน (P42) โดยยีน *pre S1* มีบทบาทในการเกาะกับเซลล์เป้าหมาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โดยปกติไวรัสตับอักเสบบี จะสร้างโปรตีนทั้ง 3 ชนิด เพื่อเป็น surface protein โดยไวรัสที่สมบูรณ์ (Dane particle หรือ complete virion) จะมีสัดส่วน major protein : middle protein : large protein ประมาณ 4:1:1 ส่วนอนุภาคที่ไม่สมบูรณ์จะมีแต่ส่วน major protein และ middle protein อีกเพียงเล็กน้อย (ศิริฤกษ์, 2543)




**ภาพที่ 2** โปรตีนที่สร้างจาก S ORF

**ที่มา:** Seeger *et al.* (2000)

1.4 แอนติเจนที่พบในไวรัสตับอับเสบบี

1.4.1 Hepatitis B surface antigen (HBsAg)

แอนติเจนชนิดนี้เป็นโปรตีนที่สร้างขึ้นมาจากยีน *S* พบโปรตีนทั้ง 3 ชนิด คือ major HBsAg, middle HBsAgและ large HBsAgโดยโปรตีนนี้ถูกสร้างจากปลายด้าน 3' ของยีน S

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และเป็นโปรตีนที่มี antigenic determinant และเป็น group-specific determinant มีอยู่ในเกือบทุกสายพันธุ์ (subtype) ของไวรัสตับอักเสบบี (ศิริฤกษ์, 2543)

1.4.2 Hepatitis B core antigen (HBcAg) และ Hepatitis B e antigen (HBeAg)

แอนติเจนทั้งสองชนิดนี้มีกรดอะมิโนร่วมกันและควบคุมการสร้างโดยยีน C ซึ่งแอนติเจนนี้จะไม่พบอิสระในเลือดแต่จะพบในเซลล์ตับที่ติดเชื้อเท่านั้น หากนำ core ของ HBV มาย่อยด้วยเอนไซม์บางชนิด HBeAg ที่ถูกคลุมอยู่จะหลุดออกมา (ชโลบล, 2540) การตรวจพบ HBeAg ในซีรั่มเป็นข้อบ่งชี้ว่า HBV กำลังเพิ่มจำนวนในเซลล์ตับ

1.4.3 HBxAg

เป็นโปรตีนขนาดเล็กที่ทำหน้าที่เป็น trans-activating protein for promoters ของไวรัสและของเซลล์ด้วย มีบทบาทในการเพิ่มจำนวนไวรัสในร่างกายของโฮสต์และอาจเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งตับอีกด้วย

1.5 การแบ่งกลุ่ม (subtype) ของไวรัส

ไวรัสตับอักเสบบีสามารถจัดกลุ่มเป็น serotype หรือ subtype ต่างๆ โดยอาศัยลักษณะความหลากหลาย (heterogeneity) ของ HBsAgซึ่ง code จากยีน S ใน S-open reading frame พบว่า HBsAgทุก subtype มี determinant a และมี determinant อื่นๆอีก คือ อาจเป็น d หรือ y และ w หรือ r นอกจากนี้ w ยังมี subdeterminantและยังพบ q determinant ในทุก subtype ยกเว้น subtype adr ซึ่งบางครั้งไม่พบ q ไวรัสตับอักเสบบีที่พบบ่อยทั่วโลกมี 9 subtype ได้แก่ ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq+ และ adrq- การศึกษา DNA ของไวรัสตับอักเสบบีที่แยกได้จากผู้ติดเชื้อเรื้อรังชาวไทย 200 ราย พบ subtype adrร้อยละ 82 และ adwร้อยละ 18

การจัด genotype อาศัยข้อมูลที่ได้จากการศึกษา sequence ของนิวคลีโอไทด์จากส่วนของ S ยีนของไวรัสตับอักเสบบีที่เก็บตัวอย่างจากทั่วโลก ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างกัน (divergence)จึงจัดกลุ่มได้เป็น 6 genotype หรือ genomic groups ได้แก่ A, B, C, D, E และ F (Zhang และ Guangwen, 2011) โดยมีรายงานการแพร่กระจายของไวรัสgenotype ต่างๆดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Group A พบแถบยุโรปตะวันออก สหรัฐอเมริกา และแถบซาฮารา จนถึงแอฟริกาใต้

Group B และ C พบแถบแปซิฟิก และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

Group D พบทั่วโลก แต่พบมากในแถบเมดิเตอร์เรเนียน ประเทศแถบตะวันออกไกล ตะวันออกกลางและเอเชียใต้

Group E พบแถบแอฟริกา บริเวณซาฮาราแถบตะวันตกจนถึงแองโกลา

Group F พบแถบแอฟริกาใต้และโพลีเนเซีย (ชโลบล, 2536 )

1.6 ลักษณะการก่อโรค

การเกิดโรคในผู้ป่วยมี 3 แบบ คือ ไม่แสดงอาการติดเชื้อ แสดงอาการแบบเฉียบพลันและติดเชื้อเรื้อรัง

1.6.1 การติดเชื้อแบบเฉียบพลัน จะมีลักษณะของโรคต่างๆดังนี้

1.6.1.1 Preclinical infection เป็นระยะก่อนจะมีการตรวจพบ HBsAg และ HBcAg ในเลือด

1.6.1.2 Subclinical hepatitis ส่วนใหญ่ของผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อโดยเฉพาะในเด็กไม่มีอาการทำให้วินิจฉัยไม่ได้ในระยะนี้ จะตรวจพบเมื่อผู้ป่วยหายจากโรคและมีภูมิต้านทานแล้ว (anti-HBsAg และ HBcAg) หรือผู้ป่วยกลายเป็นพาหะเรื้อรังรวมทั้งโรคตับเรื้อรังด้วย

1.6.1.3 Typical acute hepatitis มีอาการเฉพาะ คือ ตัวเหลือง ตาเหลือง พยาธิสภาพในตับเป็นแบบ spotty necrosis ผู้ป่วยร้อยละ 90 จะหายจากอาการแต่จะมีผู้ป่วยร้อยละ 5-10 ที่ไม่หายขาดและเรื้อรังต่อไป

1.6.1.4 Severe hepatitis มีอาการรุนแรงกว่าตับอักเสบเฉียบพลันธรรมดา เซลล์ของตับจะถูกทำลาย ซึ่งมีโอกาสเสียชีวิตหรือเป็นตับแข็งได้ร้อยละ 30

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.6.1.5 Fulminant hepatitis มีอาการรุนแรงที่สุด พบประมาณร้อยละ1 ของผู้ป่วยทั้งหมด มีโอกาสเสียชีวิตได้ถึงร้อยละ 80

1.6.1.6 Cholestatic hepatitis พบได้น้อยมากมีอาการดีซ่านหลายเดือน และจะหายเป็นปกติเอง

1.6.1.7 Prolonged hepatitis หรือ relapsing hepatitis ผู้ป่วยบางรายมีความผิดปกติเกี่ยวกับอาการและหน้าที่ของตับหลังจาก 4 เดือนไปแล้ว จะหายเป็นปกติใน 6 เดือน แต่ก็อาจมีส่วนหนึ่งเป็นตับอักเสบเรื้อรัง

1.6.2 การติดเชื้อแบบเรื้อรัง มีลักษณะของโรคดังนี้

1.6.2.1 Healthy carrier เป็นบุคคลที่ไม่มีอาการ ไม่พบความผิดปกติในการตรวจร่างกายจะพบแต่ HBsAg ในเลือดเท่านั้น พบว่าบุคคลเหล่านั้นมีโอกาสเป็นมะเร็งตับได้มากกว่าคนปกติถึง 200-300 เท่าโดยเฉพาะในคนป่วยที่เป็นเพศชาย

1.6.2.2 ตับอักเสบเรื้อรังชนิดไม่รุนแรง พยาธิสภาพของตับเป็นแบบ chronic persistent hepatitis (CPH) หรือ chronic lobular hepatitis (CLH) ไม่มีอาการรุนแรงส่วนใหญ่จะหายจากโรคได้

1.6.2.3 ตับอักเสบเรื้อรังชนิดรุนแรง พวก chronic active hepatitis (CAH) จะกลายเป็นตับแข็งหรือมะเร็งตับได้ในที่สุด

1.6.2.4 ตับแข็ง ซึ่งจะกลายเป็นมะเร็งปฐมภูมิที่ตับได้มากกว่าตับอักเสบเรื้อรัง

1.6.2.5 มะเร็งชนิดปฐมภูมิ (Primary hepatic carcinoma) เกิดจากผ่านการเป็นตับอักเสบแบบ chronic active hepatitis (CAH) และตับแข็งมาแล้ว และร้อยละ 30-80 จะพบว่าเกี่ยวข้องกับไวรัสตับอักเสบบี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.7 การตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ

1.7.1 ตรวจระดับเอนไซม์transaminaseพบว่าผู้ที่มีอาการตับอักเสบเฉียบพลันที่มีสาเหตุมาจากไวรัสตับอักเสบบี มีลักษณะเช่นเดียวกับที่พบในไวรัสตับอักเสบ เอ ซี ดี และ อี มีระดับเอนไซม์ transaminase ในเลือดสูงกว่าปกติ 5-100 เท่า ระดับ alanine aminotransferase (ALT)และaspatateaminotranferase (AST)เปลี่ยนแปลงพร้อมกันโดยเริ่มสูงขึ้นในช่วงท้ายของระยะฟักตัวและเริ่มสูงขึ้น ถ้าไม่มีอาการแทรกซ้อนระดับเอนไซม์จะกลับคืนสู่ปกติในเวลา 2 เดือน

1.7.2 ตรวจสารบ่งชี้ (markers) ต่างๆในซีรั่ม ได้แก่ HBsAg, HBeAg, anti-HBs, anti-HBeและ anti-HBc โดยวิธี Enzyme immunoassy (EIA) และ Immunochromatographictest

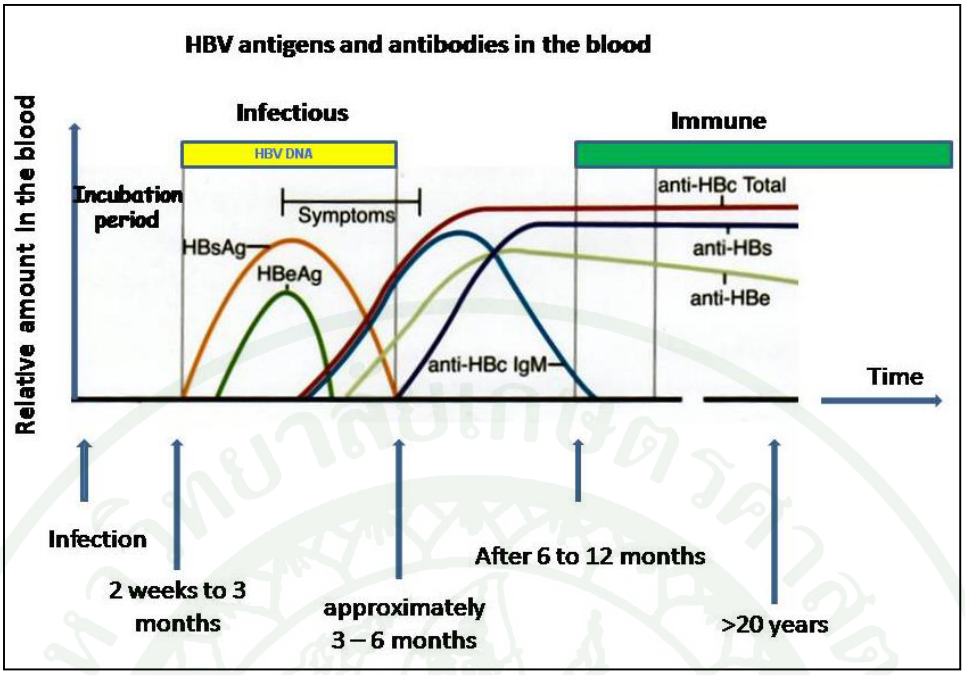
1.7.3 ตรวจหาดีเอ็นเอของไวรัสตับอักเสบบี โดยใช้เทคนิค PCR แล้วนำ amplified product มาทำ hybridization กับตัวตรวจสอบ (probe)

1.7.4 ตรวจเอนไซม์DNA polymerase ของไวรัสเพื่อเป็นการบ่งชี้ว่าไวรัสกำลังเพิ่มจำนวนอยู่

สารบ่งชี้ที่ตรวจพบเมื่อมีอาการเฉียบพลันและต่อมาหายจากระยะตับอักเสบคือ ภายใน 4 สัปดาห์ แรกพบ HBV DNA ก่อน ตามด้วย HBsAg และ HBeAg ซึ่งพบในเวลาใกล้เคียงกันแต่ HBsAg พบอยู่ได้นานกว่า HBeAg ทั้งสามนี้พบก่อนที่จะปรากฏอาการ ในระยะฟื้น anti-HBeและ anti-HBs จะปรากฏโดยอาจมีช่วงที่ตรวจไม่พบทั้ง HBsAg และ anti-HBs สารบ่งชี้อีกชนิดหนึ่งซึ่งพบตั้งแต่เริ่มแรกมีอาการ ได้แก่ IgM anti-HBc

ในกรณีที่ติดเชื้อเรื้อรังและสามารถแพร่ได้สูง จะตรวจพบ HBV DNA, HBsAg และ HBeAg ในซีรั่มไม่พบ anti-HBe แต่ถ้ามี seroconversion มักจะพบการทำลายเซลล์ตับควบคู่ไปกับการปรากฏของ anti- HBeและ HBeAg หายไป ระยะนี้ความสามารถของผู้ป่วยที่แพร่เชื้ออยู่ในระดับต่ำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์




**ภาพที่ 3** markers และลักษณะที่พบในผู้ป่วยโรคไวรัสตับอักเสบบี

**ที่มา**: Michael (2008)

1.8 การติดต่อของไวรัสตับอักเสบบี

1.8.1 Vertical Transmission เป็นการติดต่อจากแม่ไปยังลูก (Perinatal transmission) ไวรัสจากเลือดแม่ไปสู่ลูกขณะคลอดหรือสำลักน้ำคร่ำ เชื้อผ่านเข้าร่างกายทารกทางเยื่อบุปาก ลำคอ ทางเดินหายใจ หรือลอยถลอกตามผิวหนัง ถ้าแม่มีทั้ง HBeAg การติดต่อจะยิ่งสูง โดยทารกที่คลอดจากมารดากลุ่มนี้จะเป็นพาหะสูงถึงร้อยละ 70 แต่ถ้าทารกคลอดจากมารดา กลุ่มที่มี HBsAg จะเป็นพาหะร้อยละ 30

1.8.2 Horizontal transmission เป็นการติดต่อในวัยที่โตแล้ว ซึ่งเชื้อเข้าทางผิวหนังด้วยเข็มฉีดยาหรือมีบาดแผล เช่น การได้รับเลือด ถ่ายเลือดที่มีเชื้อปะปน การเจาะหู การสักตามร่างกาย หรือเชื้ออาจเข้าได้ทางเยื่อเมือกของอวัยวะสืบพันธุ์ เช่น การมีเพศสัมพันธ์กับผู้มีเชื้อนี้อยู่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.9 การควบคุมและป้องกันไวรัสตับอักเสบบี

Passive immunization โดยการฉีด hepatitis B immune globulin (HBIG) ซึ่งได้จากผู้ที่หายจากโรคที่มี anti-HBs ในปริมาณสูง แนะนำให้ใช้สำหรับป้องกันการเกิดโรคหลังจากการสัมผัสเชื้อ เช่น เมื่อเกิดอุบัติเหตุถูกตำด้วยเข็มเปื้อนเลือดซึ่งมี HBsAg หรือให้แก่เด็กทารกที่เกิดจากแม่ที่ตรวจพบ HBsAg ซึ่งควรได้รับ HBIG ภายใน 7 วัน และจะได้ผลดีถ้าได้รับวัคซีน (active immunization) ควบคู่ไปพร้อมกันด้วย

Active immunization การกระตุ้นโดยการให้วัคซีน โดยวัคซีนที่ใช้ในปัจจุบันได้แก่ recombinant vaccine เป็นการเตรียมโดยใช้พันธุวิศวกรรม ซึ่งโคลนเฉพาะยีนส่วน *S*ลงใน experiment plasmid สำหรับเซลล์โฮสต์ที่ใช้ผลิตแอนติเจนคือเซลล์ยีสต์ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* หรือเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น Chinese hamster ovary (CHO) cells เป็นต้นส่วน plasma-derived vaccine เป็นวัคซีนที่เตรียมจากพลาสมาของผู้ที่เป็นพาหะโดยนำ HBsAgมาทำให้บริสุทธิ์แล้วใช้สารเคมีหรือความร้อนทำลายไวรัสทุกชนิดที่ปนเปื้อน นอกจากนี้ยังมีการวินิจฉัยและพัฒนาวัคซีนที่อยู่ในรูปของดีเอ็นเอวัคซีน (DNA Vaccine) ที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งพบว่าสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันภายในเซลล์ให้เกิดการสร้างแอนติบอดีได้ (Lucyna, 2007 )

**2. ดีเอ็นเอวัคซีน (DNA vaccine)**

หลักการของดีเอ็นเอวัคซีน คือ การนำยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนใดๆที่สนใจเชื่อมเข้ากับ expression vector ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ยีนที่เชื่อมต่อใน plasmid vector นั้นจะสร้างเป็น encoded protein ออกมาซึ่งถ้าการแสดงออกของยีนดังกล่าวเกิดขึ้นในร่างกายของสิ่งมีชีวิตและถ้า encoded protein นั้นๆมีคุณสมบัติเป็น antigenic protein ก็จะไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและทำให้ร่างกายเกิดภูมิคุ้มกันตอบสนองต่อโปรตีนนั้นๆขึ้นโดยพบว่าระบบภูมิคุ้มกันที่ถูกกระตุ้นให้เกิดขึ้นโดยวิธีนี้มีทั้ง humoral mediated immunity, cell-mediated immunity ทั้งกระตุ้น CD4+ lymphocytes และ CTL response

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.1 กลไกการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดย DNA vaccine

เมื่อฉีด DNA ที่กำหนดการสร้างโปรตีนที่สนใจและเชื่อมต่ออยู่ในพลาสมิดเวคเตอร์ที่เหมาะสมเข้าสู่ร่างกาย พลาสมิดดีเอ็นเอจะเข้าสู่เซลล์เป้าหมายซึ่งอาจเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหรือเซลล์ใต้ผิวหนัง ทั้งนี้ขึ้นกับ route และวิธีการฉีด โดยอาศัยกลไก transcription และ translation ของเซลล์ยีนที่แทรกอยู่ใน plasmid vector จะถูกสร้างเป็น antigenic protein ซึ่งจะถูก process เป็น peptide antigen ขนาดเล็กภายในไซโตพลาสซึมและส่งไปจับกับ majorhistocompatibility complex (MHC) class I molecule จากนั้นจะถูกส่งไปบนผิวเซลล์เพื่อกระตุ้น CD8+ lymphocytes เกิดเป็น cytotoxic T lymphocytes ซึ่งสามารถทำลาย infected cells ได้ (เรียกระบบภูมิคุ้มกันแบบนี้ว่า CTL response) Antigenic protein ส่วนหนึ่งจะถูกปล่อยออกนอกเซลล์ซึ่งอาจเกิดจาก antigenic protein นั้นมีคุณสมบัติเป็น secreted protein หรือเกิดจากการที่เซลล์ถูกทำลาย โดย antigenic protein ที่ออกมานอกเซลล์เหล่านี้จะถูก process และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเช่นเดียวกัน exogenous antigen คือถูก uptake โดย antigen presenting cells จากนั้นจะถูกตัดเป็นเปปไทด์ท่อนสั้นๆแล้วส่งออกมาบนผิวเซลล์ร่วมกับ MHC class II molecule และส่งไปกระตุ้น CD4+ cells ให้หลั่ง lymphokinesออกมา ซึ่ง lymphokines เหล่านี้สามารถกระตุ้นให้เซลล์ต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น monocytes, macrophages, neutrophils, B lymphocytes, CD4+ lymphocytes, CD8+ lymphocytes และ NK cells ให้ทำงานได้ดียิ่งขึ้นการทำงานของเซลล์เหล่านี้ก่อให้เกิดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่เรียกว่า cell-mediated immunity antigenic protein ส่วนหนึ่งสามารถกระตุ้น B lymphocytes และโดยความช่วยเหลือของ lymphokines ที่ปล่อยมาจาก activated CD4+ lymphocytes ทำให้ B lymphocytes ที่ถูกกระตุ้นแล้วนี้กลายเป็น plasma cells สร้างแอนติบอดีออกมาแอนติบอดีที่สร้างออกมานี้สามารถจับและทำลายเชื้อโรคได้เกิดเป็นการตอบสนองทาง humoral mediated immunity ขึ้น

2.2 การประยุกต์ใช้ DNA vaccine

จากหลักการของวิธี DNA vaccination ดังกล่าวทำให้เชื่อว่าวิธีนี้น่าจะสามารถนำมาแทนวัคซีนที่มีใช้กันในปัจจุบันจึงได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในสัตว์ทดลองชนิดต่างๆ ในโรคต่างๆ มากมายเช่น Hepatitis B, Hepatitis C, Influenza, Malaria, Tuberculosis, Leishmaniasis, AIDS หรือแม้แต่มะเร็งและพบว่า DNA vaccine ใช้ได้ผลดีมาก นอกจากการนำวิธี DNA vaccination มาใช้ในแง่ของการป้องกันโรคแล้ว ยังได้มีการนำวิธี DNA vaccination นี้มาประยุกต์ใช้ในการผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีนที่สนใจเพื่อใช้งานอีกด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3 ข้อดีของ DNA vaccine

2.3.1. DNA vaccine สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทั้งชนิด humoral mediated immunity และ cell-mediated immunity ทั้งการกระตุ้น CD4+ lymphocytes และ CTL response

2.3.2. การเตรียมDNAทำได้ง่ายและ DNA ที่เตรียมได้มีความคงตัวสูง

2.3.3. สามารถเตรียมเป็น recombinant vaccine โดยการแทรกยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนของเชื้อโรคหลายชนิดเข้าไปในเวคเตอร์อันเดียวกัน ทำให้การฉีดวัคซีนเพียงครั้งเดียวได้ผลกับโรคหลายชนิด

2.4 ข้อด้อยของ DNA vaccine

2.4.1. DNA ที่ให้เข้าไป อาจไปแทรกอยู่ในโครโมโซมของผู้รับทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของพันธุกรรมและมีผลต่อการเกิดมะเร็ง

2.4.2. Antibiotic resistant genes ที่ใช้ในเวคเตอร์อาจมีผลกับผู้รับวัคซีน

**3. การตรวจวินิจฉัยทางภูมิคุ้มกันวิทยา (Immunodiagnosis)**

เป็นการตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีโดยอาศัยคุณสมบัติสำคัญประการหนึ่งของแอนติบอดี คือ สามารถจับกับแอนติเจนได้อย่างจำเพาะ (specific) ซึ่งมีด้วยกันหลายวิธีดังนี้

3.1 วิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

อาศัยหลักการให้แอนติเจนหรือแอนติบอดีที่เกาะอยู่บนวัสดุแข็ง เช่น microtiter plate, bead หรือ disk ปฏิกิริยาแต่ละขั้นตอนจะต้องมีการล้างเพื่อเอาส่วนเกินที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออกจึงเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูงมาก

เอนไซม์ที่นิยมใช้ใน ELISA ได้แก่ Horseradish peroxidase (substrate ที่นิยมใช้ คือ hydrogen peroxide + o-phenylenediamine ให้สีน้ำตาล ) alkaline phosphatase (substrate ที่นิยมใช้ คือ p-nitrophenylphosphate ให้สีเหลือง) เป็นต้นซึ่งสามารถแบ่งชนิดของ ELISA ได้ดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.1.1. Direct ELISA (Double antibody sandwich assay)

เป็นวิธีที่ใช้ตรวจหาแอนติเจน โดยนำแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนมาเคลือบบนผิวของวัสดุแข็ง (solid phase) ด้วยความเข้มข้น 1-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใน coating buffer ที่ไม่มีสารพวก detergent หรือโปรตีนแปลกปลอมอื่นๆ แล้วเติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจลงไป แอนติเจนในตัวอย่างจะเข้าจับกับแอนติบอดีที่เคลือบอยู่บนผิวของ solid phase จากนั้นล้างเอาส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก แล้วเติมแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับแอนติเจนซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ หรือเรียกว่า conjugate ลงไป แอนติบอดีตัวที่สองนี้จะไปจับกับแอนติเจนและติดอยู่บนผิววัสดุนั้นด้วย ทำให้เกิดลักษณะคล้าย sandwich ซึ่งมีแอนติเจนอยู่ตรงกลาง ประกบอยู่กับแอนติบอดี หลังจากนั้นล้าง conjugate ที่ไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนออก แล้วเติม substrate ลงไป จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของ substrate กลายเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสี โดยความเข้มข้นของสีจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนติเจนที่มีอยู่ในตัวอย่าง

3.1.2. Indirect ELISA

เป็นวิธีการตรวจหาได้ทั้งแอนติเจนและแอนติบอดี ถ้าต้องการตรวจหาแอนติบอดีก็นำแอนติเจนซึ่งทราบชนิดแล้วมาติดกับพื้นผิวของ solid phase ด้วยความเข้มข้น 1-10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใน coating buffer จากนั้นล้างเอาส่วนที่เกินออก แล้วเติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจหาแอนติบอดีลงไป แอนติบอดีในตัวอย่างจะเข้าจับกับแอนติเจนที่ติดอยู่บนผิววัสดุนั้น จากนั้นล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก แล้วเติมแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ลงไปทำปฏิกิริยาอีกชั้นหนึ่งแล้วล้างอีกครั้ง เนื่องจากแอนติบอดีตัวที่สองจะสามารถจับกับโมเลกุลของแอนติบอดีซึ่งเกาะติดอยู่กับโมเลกุลของแอนติเจนบนผิว solid phase ด้วย หลังจากนั้นเติม substrate ลงไป จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของ substrate และมีสีเกิดขึ้น ความเข้มของสีจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนติบอดีที่มีอยู่ในตัวอย่างที่นำมาทดสอบ (Goding, 1996)

ถ้าต้องการตรวจหาแอนติเจน ก็นำแอนติบอดีซึ่งมีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการหามาเคลือบพื้นผิวของ solid phase ใน coating buffer จากนั้นล้างเอาส่วนที่เกินออก แล้วเติมตัวอย่างที่ต้องการตรวจหาแอนติเจนลงไป แอนติเจนในตัวอย่างจะเข้าจับกับแอนติบอดีที่อยู่บนผิววัสดุนั้น จากนั้นล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก แล้วจึงเติมแอนติบอดีตัวที่สองที่สามารถจับกับโมเลกุลของแอนติเจนในตำแหน่งของ antigenic epitope ที่ต่างกับแอนติบอดีตัวแรกที่ยึดติดอยู่บนผิวของ solid phase แล้วล้างส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก จากนั้นจึงเติมแอนติบอดีซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ซึ่งสามารถจับกับแอนติบอดีตัวที่สองลงไปทำปฏิกิริยาอีกชั้นหนึ่ง แล้วจึง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ล้างออกอีกครั้ง หลังจากนั้นเติม substrate ลงไป จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของ substrate และมีสีเกิดขึ้น ความเข้มของสีจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนติเจนที่มีอยู่ในตัวอย่างที่นำมาทดสอบ

3.2 วิธี Immunofluorescence assay

เป็นวิธีที่ตรวจได้ทั้งแอนติเจนและแอนติบอดี ส่วนใหญ่ถูกนำมาใช้ในการตรวจหาแอนติเจนหรือแอนติบอดีในเนื้อเยื่อหรือที่อยู่ผิวเซลล์ ดังนั้นต้องมีการเตรียมตัวอย่างหรือเซลล์ที่ต้องการตรวจให้เกาะติดบนแผ่นสไลด์ก่อน หลักการของวิธี immunofluorescence คือ นำแอนติบอดีมาติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (fluorescent dye) ได้แก่ fluorescein isothiocyanate (FITC), rhodamine และ phycoerythrin เป็นต้น โดยโมเลกุลของสีที่นำมาติดกับแอนติบอดีจะไม่ทำให้ความจำเพาะในการจับกับแอนติเจนเปลี่ยนแปลงไป เมื่อสารเรืองแสงถูกกระตุ้นด้วยแสง ultraviolet ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดแสงในกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (fluorescence microscope) สารเรืองแสงจะดูดกลืนแสงที่มีพลังงานสูงและมีความยาวคลื่นต่ำ และปล่อยแสงที่มีพลังงานต่ำและมีความยาวคลื่นสูงกว่าออกมา สารเรืองแสงต่างชนิดกันจะดูดกลืนแสงและปล่อยแสงที่ความยาวคลื่นต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น FITC ดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 490 - 495 นาโนเมตร และปล่อยแสงที่มีความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ซึ่งเป็นแสงสีเขียวได้มากที่สุด ภายในกล้องจุลทรรศน์เรืองแสงจะมีแผ่นกรองแสงที่กันมิให้แสงที่ออกมาโดยตรงจากแหล่งกำเนิดแสงผ่านเข้าตา แต่จะยอมให้แสงที่ปล่อยออกมาจากสารเรืองแสงผ่านมาได้ ดังนั้น ตำแหน่งใดที่มีสารเรืองแสงอยู่ก็จะมองเห็นเป็นสีเขียว แสดงว่าตำแหน่งนั้นมีแอนติบอดีจับอยู่กับแอนติเจน วิธี Immunofluorescence แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ direct immunofluorescence และ indirect immunofluorescence

3.2.1 Direct immunofluorescence

วิธีนี้นิยมใช้ในการตรวจหาแอนติเจนที่อยู่ในเนื้อเยื่อ โดยนำ tissue section หรือเซลล์ที่ต้องการตรวจหาแอนติเจนมาทำให้ติด (fix) บนแผ่นสไลด์ แล้วเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงลงบนแผ่นสไลด์ จากนั้นล้างแอนติบอดีส่วนที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออก ถ้ามีแอนติเจนอยู่อยู่ในเนื้อเยื่อหรือบนผิวเซลล์นั้น แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงก็จะยังคงจับอยู่กับเนื้อเยื่อได้ เมื่อนำไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง จะเห็นการเรืองแสงตรงตำแหน่งที่มีแอนติเจนจับอยู่กับแอนติบอดี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2.2 Indirect immunofluorescence

เป็นวิธีที่นิยมใช้ตรวจแอนติบอดี โดยนำแผ่นสไลด์ที่มีแอนติเจนอยู่อาจเป็น tissue section หรือเซลล์มาเติมแอนติบอดีที่ต้องการทราบว่ามีแอนติเจนที่จำเพาะต่อกันหรือไม่ลงไป ล้างแอนติบอดีส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก แล้วเติม anti-immunoglobulin ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงลงบนแผ่นสไลด์ anti-immunoglobulin จะไปจับกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนในเนื้อเยื่อ ล้างอีกครั้งแล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง(fluorescence microscope) ดังนั้น ตำแหน่งใดที่มีสารเรืองแสงอยู่จะมองเห็นเป็นสีเขียวแสดงว่าตำแหน่งนั้นมีแอนติเจนจับอยู่กับแอนติบอดี

3.3 Immunochromatographic assay

เทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟีหรือ lateral flow test ได้ถูกพัฒนาขึ้นจากพื้นฐานของ 3 เทคนิคคือ latex agglutination tests, sandwich assay และโครมาโทกราฟี (Yallow and Berson, 1959) หลักการของเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟีคือการนำแอนติบอดีมาติดฉลากกับอนุภาค bead ที่มีสีเมื่อให้แอนติบอดีที่ติดฉลากทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่จำเพาะแล้วจะเกิดเป็นantigen antibody complex โดย complex ดังกล่าวจะเคลื่อนที่ไปบน solid support ด้วยแรง capillary flow จนมาถึงตำแหน่งบน solid support ที่ถูกเคลือบด้วยแอนติบอดีอีกชนิดที่จำเพาะต่อแอนติเจนบริเวณนี้เรียกว่า test line ซึ่ง complex ข้างต้นจะถูกจับอยู่ที่ test line เกิดให้เห็นเป็นแถบสีการเกิดแถบสีจะแปรผันตามปริมาณแอนติเจนที่พบในตัวอย่างซึ่งสามารถยืนยันความถูกต้องของการตรวจสอบได้จาก complex หรือแอนติบอดีที่เหลือจากการจับกันตรงตำแหน่ง test line ที่จะเคลื่อนต่อไปบน solid support จนไปถึงบริเวณที่เคลือบแอนติบอดีอีกชนิด (secondary antibody) เรียกบริเวณนี้ว่า control line ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากแอนติบอดีตัวแรกและแอนติบอดีที่ control line นี้จะทำให้เกิดแถบสีอีกแถบหนึ่ง

หลักการของปฏิกิริยาในเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟีแบ่งเป็น 2 แบบได้แก่แบบ Double antibody sandwich assay (DAS) ซึ่งส่วนใหญ่นิยมใช้กับการตรวจแอนติเจนที่มีขนาดใหญ่ และมี antigenic sites หลายชนิดสำหรับหลักการของวิธีการนี้เหมือนกับหลักการดังกล่าวข้างต้นและแบบ competitive inhibition วิธีนี้นิยมใช้ตรวจแอนติเจนที่มีขนาดเล็กและมี antigenic sites เพียงหนึ่งชนิดเท่านั้นหลักการของวิธีนี้คล้ายกับแบบ DAS แต่ที่แตกต่างคือ ตำแหน่งของ test line จะถูกเคลือบด้วยแอนติเจนชนิดเดียวกับที่ต้องการตรวจสอบดังนั้นถ้าใน ตัวอย่างมีแอนติเจนอยู่มากพอ

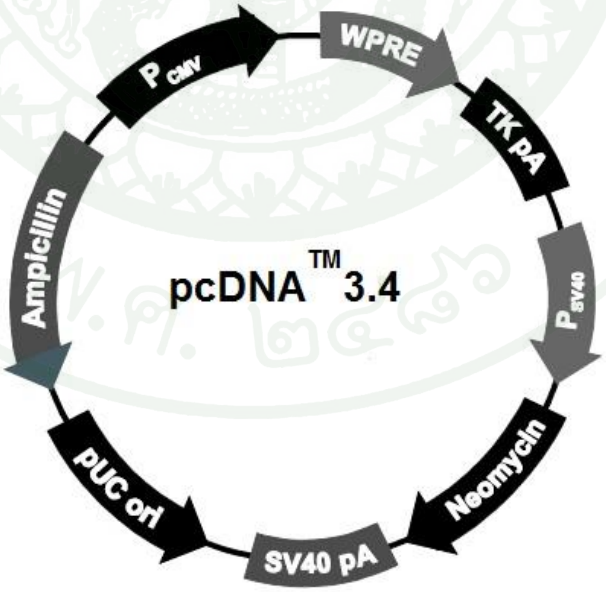
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แอนติบอดีจะจับกับแอนติเจนจนหมดและไม่เหลือพอที่จะจับกับ แอนติเจนที่ test line เพราะฉะนั้นตำแหน่ง test line จะไม่เกิดแถบสีให้เห็นทั้งนี้ผลที่อ่านได้จะแปรผกผันกับปริมาณแอนติเจนที่ตรวจพบในตัวอย่าง

จากผลการตรวจสอบที่นอกจากสามารถอ่านได้ด้วยตาเปล่าให้ผลถูกต้องรวดเร็วสะดวกต่อการพกพาและการใช้นอกจากจะสามารถตรวจสอบผลได้ด้วยตนเองแล้วในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคอิมมูโนโครมาโทกราฟีให้สามารถตรวจสอบเชื้อได้มากกว่าหนึ่งเชื้อโดยใช้แอนติบอดีติดฉลากกับเม็ดสีที่แตกต่างกันได้สำเร็จทำให้วิธีการตรวจสอบโดยใช้หลักการโครมาโทกราฟีได้รับความนิยมที่จะนำมาใช้ตรวจสอบในงานทางด้านการแพทย์สัตว์การเกษตรอุตสาหกรรมอาหารและสภาพแวดล้อมเพิ่มมากขึ้น (Stimson and Sinclair, 1974)

**4. Mammalian expression vector pcDNA3.4™**

ในการทดลองนี้ใช้เวคเตอร์ pcDNA3.4™(Invitrogen)สำหรับ Mammalian cell line ในการ expression โดยเวคเตอร์จะมีส่วน CMV promoter เพื่อเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีนหรือเพิ่มการหลั่งของโปรตีนออกมาภายนอกเซลล์ Mammalian ซึ่งโครสร้างของเวคเตอร์ประกอบไปด้วยส่วนต่างๆดังแสดงในภาพที่ 4




**ภาพที่ 4** แผนภูมิส่วนประกอบต่างๆของเวคเตอร์ pcDNA™3.4

**ที่มา**: Life Technology (2012)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

**ตารางที่ 1** ส่วนประกอบและหน้าที่ของเวคเตอร์ pcDNA™3.4

| ส่วนประกอบ | หน้าที่ |
|---|---|
| Full length human cytomegalovirus (CMV) promoter | เพิ่มประสิทธิภาพหรือการแสดงออกของโปรตีนให้สูงขึ้น (Anderssonet *al*.,1989) |
| WPRE (Woodchuck Posttranscriptional Regulatory Element) | ทำให้การแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น (Zuffereyet *al*.,1998) |
| Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase (TK) | ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการหยุดกระบวนtranscription และ polyadenylationของ mRNA (Cole anStacy.,1985) |
| SV40 early promotor and origin | เพิ่มประสิทธิภาพและการแสดงออกของยีนที่ต้านต่อ neomycin ให้สูงขึ้น |
| Neomycin resistance gene | ช่วยในการคัดเลือกtransfectant ใน mammalian cells |
| SV40 early polyadenylation signal | ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการหยุดกระบวนการ transcription และ polyadenylation ของ mRNA |
| pUC origin | ช่วยเพิ่ม copy number ให้สูงขึ้นใน *E.coli* |
| Ampicillin (*bla*) resistance gene | ช่วยในการคัดเลือกหลังการ transform เข้า *E.coli* |

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

**5. Expi 293F™ cell line**

ในงานวิจัยใช้ Expi293F™ cell line ถูกพัฒนามาจาก Expi293 cell line ซึ่งเป็นเซลล์ primary embryonic human kidney โดยสามารถเลี้ยงและเจริญเติบโตได้ในอาหารที่ไม่มีเซรั่ม (Expi 293F™ Expression medium) และมีความสามารถในการผลิตโปรตีนในระดับที่สูง จากการทดลองใช้ ExpiFectamine™293 reagent ในการ tranfectionvector DNA เข้า Expi293F™ cell lineที่มีความหนาแน่น 1 x $10^6$ เซลล์ เลี้ยงภายใต้สภาวะ 8%$CO_2$ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถผลิตโปรตีนได้สูงถึง 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (Life Technology.,2013) ซึ่งเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นเซลล์เพื่อใช้ในการผลิตโปรตีนที่ต้องการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

# อุปกรณ์และวิธีการ

## อุปกรณ์

1. พลาสมิดที่บรรจุยีน Hepatitis B Surface Antigen (*HBsAg*)

2. Primer ที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน

2.1 PCR primer สำหรับยีน HBsAgส่วน *PreS2+S*

| ชื่อ primer | ลำดับนิวคลีโอไทด์ |
|---|---|
| MUKleader2/2 HBsAgPreS2 For | 5'CTG CTG CTC TGG GTT CCA GGT TCC CAC GGC ATG CAG TGG AAC TCC ACA ACA3' |
| HBsAg Rev | 5'TCA AAT GTA TAC CCA AAG ACA AAA3' |

2.2 PCR primer extension สำหรับยีน HBsAg ส่วน *PreS2+S*

| ชื่อ primer | ลำดับนิวคลีโอไทด์ |
|---|---|
| MUKleader1/2 For | 5'ATG GAG ACA GAC ACA CTC CTG CTT TGG GTA CTG CTG CTC TGG GTT CCA GGT3' |
| HBsAgStreptag Rev | 5'TCA CTT TTC GAA TTG AGG GTG GGA CCA AATGTA TAC CCA AAG ACA3' |

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

| ชื่อ primer | ลำดับนิวคลีโอไทด์ |
|---|---|
| XbaIKozkleader For | 5'GAC TCT AGA GGA TCG AAC CCT GCC GCC ACC ATG GAG ACA GAC ACA CTC CTG3' |
| StreptagAgeI Rev | 5'CTA ACC GGT AGG GAT CGA ACC CTT TCA CTT TTC GAA TTG AGG GTG GGA CCA3' |

2.3 PCR primer สำหรับยีน HBsAgส่วน *S*

| ชื่อ primer | ลำดับนิวคลีโอไทด์ |
|---|---|
| MUKleader2/2 HBsAgFor | 5'CTG CTG CTC TGG GTT CCA GGT TCC CAC GGC ATG GAG AAC ACA ACA TCA GGA3' |
| HBsAg Rev | 5'TCA AAT GTA TAC CCA AAG ACA AAA3' |

2.4 PCR primer extensionสำหรับยีน HBsAgส่วน*S*

| ชื่อ primer | ลำดับนิวคลีโอไทด์ |
|---|---|
| Mukleader1/2 For | 5'ATG GAG ACA GAC ACA CTC CTG CTT TGG GTA CTG CTG CTC TGG GTT CCA GGT3' |
| StreptagAgeI Rev | 5'CTA ACC GGT AGG GAT CGA ACC CTT TCA CTT TTC GAA TTG AGG GTG GGA CCA3' |

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

| ชื่อ primer | ลำดับนิวคลีโอไทด์ |
|---|---|
| XbaIKozMUKleader For | 5'GAC TCT AGA GGA TCG AAC CCT GCC GCC ACC ATG GAG ACA GAC ACA CTC CTG3' |
| StreptagAgeI Rev | 5'CTA ACC GGT AGG GAT CGA ACC CTT TCA CTT TTC GAA TTG AGG GTG GGA CCA3' |

3. Mammalian expression vector pcDNA3.4™(Invitrogen)

4. KOD DNA polymerase (Novagen)

5. T4 DNA ligase (Promega)

6. 2xGoTaq® Green Master mix (Promega)

7. BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)

8. *Escherichia coli* Top10: F– *mcr*AΔ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC)Φ80*lac*ZΔM15 (Invitrogen)

9. Rabbit anti-HBsAg polyclonal antibody (Arista Biological,Inc)

10. Mouse anti-HBsAg HRP conjugated monoclonal antibody โคลน HB3 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์)

11. Anti- mouse immunoglobulins :Alexa (Invitrogen)

12. GenCarrier-1™ transfection reagent (Epoch life Science)

13. Expi 293F™ cell line (Invitrogen)

14. Expi 293F™ Expression medium (Gibco)

15. Polystylene flask ขนาด 125 ml

16. สารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆที่ใช้ในการทำ PCR เช่น $MgCl_2$, primer, dNTP mixture

17. เครื่องแก้วที่จำเป็นและอุปกรณ์ในการเลี้ยงเซลล์ เช่น syringe, flask, beaker, cryotube, pipette, ELISA plate และ culture flask

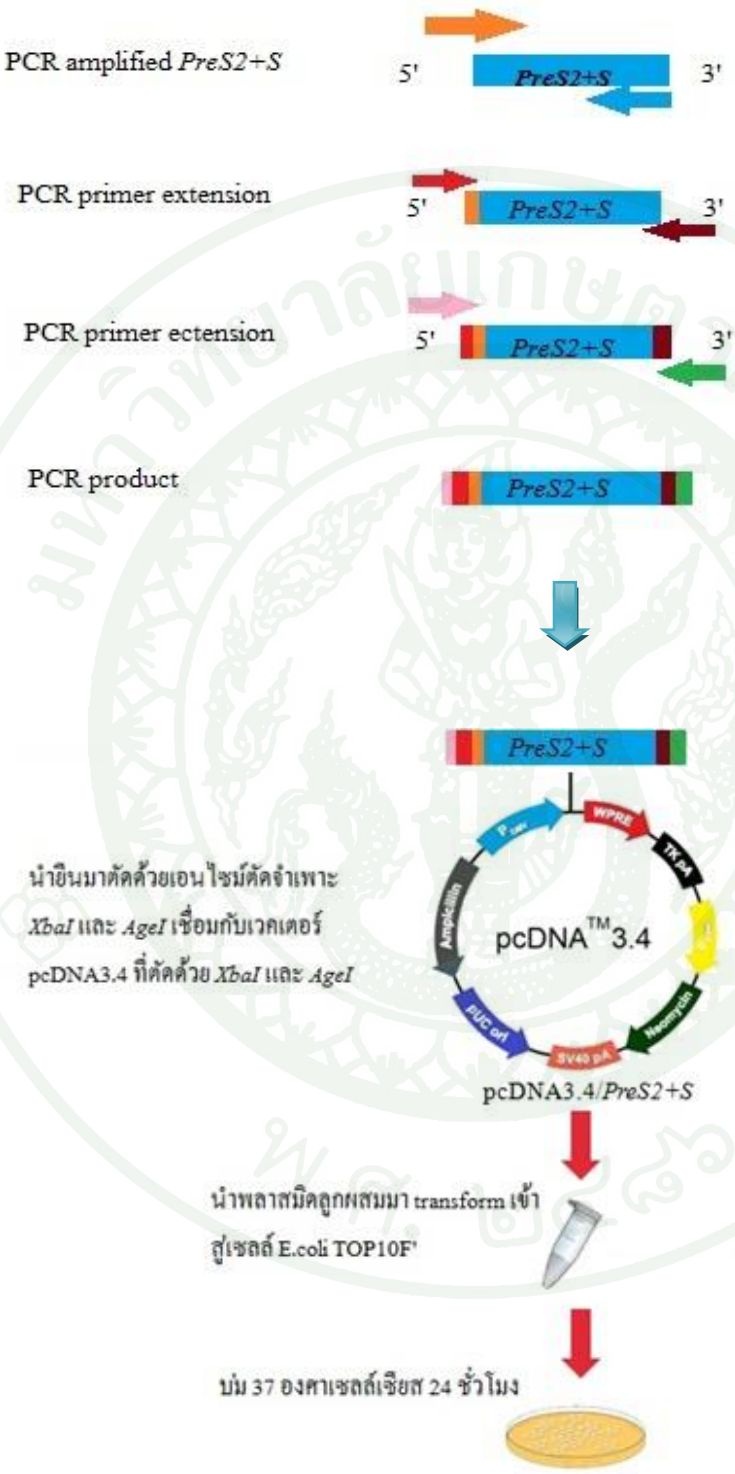
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

18. เครื่องมือที่จำเป็น

- PCR Thermal cycler
- Refrigerated centrifuge
- pH meter
- Water bath
- Agarose gel electrophoresis set
- Polyacrylaminde gel electrophoresis and bloting set
- ELISA reader
- Biosaftycarbinet
- Carbondioxide incubator
- Microcentrifuge
- Fluorescent microscope

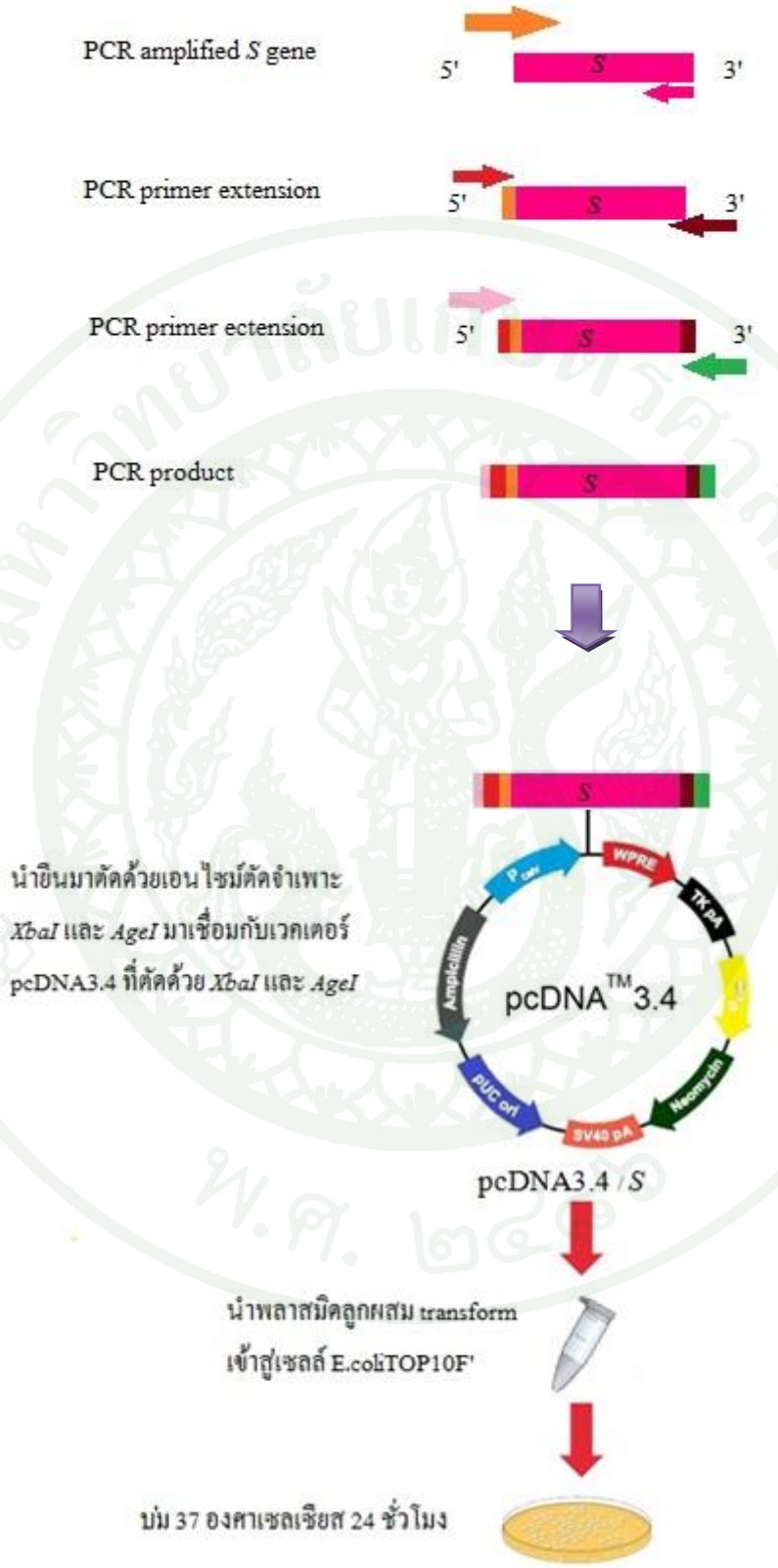
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

**วิธีการ**




**ภาพที่ 5** แผนผังวิธีการสร้างพลาสมิดลูดผสมที่มียีน *PreS2+S*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์




**ภาพที่ 6** แผนผังวิธีการสร้างพลาสมิดลูดผสมที่มียีน *S*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

**1. การเพิ่มปริมาณยีน *PreS2+S* และ *S***

เพิ่มปริมาณยีน *PreS2+S* และ *S* จากพลาสมิดที่บรรจุยีน Hepatitis B surface antigen ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ MUKleader2/2 HBsAgPreS2 forward primer คู่กับ HBsAg reverse primer สำหรับยีน *PreS2+S* และ MUKleader2/2 HBsAg forward primer คู่กับ HBsAg reverse primer สำหรับยีน *S* โดยเตรียมสารในการทำปฏิกิริยาดังนี้

| **ส่วนประกอบ** | **ปริมาตร(µl)** | **ความเข้มข้น** |
|---|---|---|
| 10x buffer | 2.5 | 1x |
| 25 mM $MgCl_2$ | 1.0 | 0.5 mM |
| dNTP(2 mM each) | 2.5 | 0.2 mM (each) |
| 10 µM primer For | 1.0 | 0.2 µM |
| 10 µM primer Rev | 1.0 | 0.2 µM |
| Template DNA | 0.25 | |
| KOD DNA polymerase(2.5 U/µl) | 0.2 | 0.01U/µl |
| PCR grade water | 16.55 | |
| รวม | 25.0 | |

จากนั้นนำมาทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermal cycler) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นหมุนเวียนอุณหภูมิ 3 ระดับที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที ตามด้วยอุณหภูมิ 59 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที และ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 วินาที จำนวน 30 รอบ จากนั้นตรวจสอบ PCR product ด้วย 1.2% agarosegel electrophoresis ก่อนนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด GenCatch™ PCR Purification Kit

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

**2. การเตรียม PCR product ให้มีความบริสุทธิ์**

นำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด GenCatch™ PCR Purification Kit มีขั้นตอนดังนี้

2.1 ทำการปรับปริมาตรของ PCR product ด้วย nuclease free water ให้ได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

2.2 เติม PX buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน นำ GenCatch™ column วางลงบน collection tube แล้วจึงถ่ายตัวอย่างที่เตรียมไว้ใส่ลงใน column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

2.3 ปิเปตส่วนใสข้างล่างทิ้ง จากนั้นล้าง column ด้วย WN buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

2.4 ปิเปตส่วนใสข้างล่างทิ้งแล้วล้าง column อีกครั้งด้วย WS buffer 500 ไมโครลิตร โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000x g เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

2.5 ปิเปตส่วนใสข้างล่างทิ้งแล้วนำ column เปล่าไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำบัฟเฟอร์ออกออกให้หมด

2.6 ย้าย column ใส่ในหลอด microtubeแล้วเติม Elution buffer ปริมาตร 30 - 50 ไมโครลิตร ลงตรงกลางเมมเบรนตั้งไว้ประมาณ 3 - 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.7 แล้วนำส่วนใสที่ได้ในหลอด microcentube ไปวัดค่าการดูดคลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เพื่อคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ ก่อนนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้งานต่อไป

**3. การเติมส่วน secretory signal sequence และ Streptag sequence**

นำ purified PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *PreS2+S* และ *S* มาเติมส่วน secretory signal sequence และ Streptag sequence ด้วยเทคนิค Primer extension PCR โดยใช้ MUKleader1/2 forward primer และ HBsAgStreptag reverse primer สำหรับยีน *PreS2+S* ส่วนยีน S ใช้ MUKleader1/2 forward primer และ StreptagAgeI reverse primer โดยการเตรียมสารและปฏิกิริยาเหมือนปฏิกิริยาก่อนหน้าจากนั้นตรวจสอบ PCR product ด้วย 1.2% agarosegel electrophoresis ก่อนนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด GenCatch™ PCR Purification Kit

**4. การเติมส่วน Kozakconcensus sequence และ restriction site**

นำ purified PCR product ที่ได้จากการเติมส่วน secretoryr sequence และ streptag sequence มาเติมส่วน Kozakconcensus sequence และ restriction site ด้วยเทคนิค Primer extension PCR โดยใช้ XbaIKozkleader forward primer และ StreptagAgeI reverse primer โดยทำการเตรียมสารและปฏิกิริยาเหมือนปฏิกิริยาก่อนหน้าจากนั้นทำการตรวจสอบ PCR product ด้วย 1.2% agarosegel electrophoresis ก่อนนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด GenCatch™ PCR Purification Kit

**5. การสร้างพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid)**

5.1 การสกัด pcDNA3.4 plasmid vector ด้วยชุดสกัดพลาสมิด GenCatch™ Plasmid DNA Miniprep Kit

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.1.1 ลงเชื้อ *E.coli* ที่มีพลาสมิด pcDNA3.4 จาก glycerol stock culture ในอาหาร 2XYT-AG ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบเป็นเวลา 16 ชั่วโมง

5.1.2 ตกตะกอนแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้องแล้วปิเปตส่วนใสออก

5.1.3 เติม MX1 buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนโดยผสมให้เข้ากันด้วยการปิเปตขึ้นลง

5.1.4 เติม MX2 buffer ปริมาตร 350 ไมโครลิตร เพื่อทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกโดยผสมให้เข้ากันด้วยวิธีกลับหลอดไปมาเบาๆ5-6 ครั้ง แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3-5 นาที

5.1.5 เติม MX3 buffer ปริมาตร 350 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วยวิธีกลับหลอดไปมา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

5.1.6 ปิเปตส่วนใสลงในคอลัมน์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่10,000x g เป็นเวลา 1 นาที

5.1.7 เติม WN buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำคอลัมน์ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที

5.1.8 ปิเปตส่วนใสที่ผ่านคอลัมน์ออก แล้วเติม WS buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที

5.1.9 ปิเปตส่วนใสที่ผ่านคอลัมน์ออกแล้วนำคอลัมน์เปล่าไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g เป็นเวลา 2 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.1.10 ย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอด microtube แล้วเติม Elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g เป็นเวลา 1 นาที

5.1.11 นำส่วนใสที่ได้ในหลอด microtubeไปวัดค่าความดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เพื่อคำนวณความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้งานต่อไป

5.2 การเตรียมเวคเตอร์ pcDNA3.4

นำเวคเตอร์ pcDNA3.4 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *AgeI* โดยเตรียมสารในการทำปฏิกิริยาดังนี้

| **ส่วนประกอบ** | **ปริมาตร(µl)** |
|---|---|
| 10X NEbuffer#4 | 5.0 |
| 100XBSA | 0.5 |
| DNA (~2 µg) | 50 |
| *XbaI* (10 U/ µl) | 1.5 |
| *AgeI*(10 U/ µl) | 1.5 |
| Nuclease free water | 1.5 |
| รวม | 60.0 |

จากนั้นนำ reaction ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด GenCatch™ PCR Purification Kit

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.3 การเตรียมชิ้นยีน *PreS2+S* และ *S*

นำชิ้นยีน *PreS2+S* และ *S* ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *AgeI* โดยเตรียมสารในการทำปฏิกิริยามีดังนี้

| **ส่วนประกอบ** | **ปริมาตร(µl)** | |
|---|---|---|
| | ยีน *PreS2+S* | ยีน *S* |
| 10X NEbuffer#4 | 5.0 | 5.0 |
| 100XBSA | 0.5 | 0.5 |
| DNA (~1 µg) | 6.5 | 9.4 |
| *XbaI* (10 U/ µl) | 0.5 | 0.5 |
| *AgeI*(10 U/ µl) | 0.5 | 0.5 |
| Nuclease free water | 31.0 | 34.1 |
| รวม | 50.0 | 50.0 |

จากนั้นนำ reaction mixture ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด GenCatch™ PCR Purification Kit

5.4การเชื่อมชิ้นยีน (*PreS2+S*และ *S*) เข้ากับเวคเตอร์ pcDNA3.4

5.4.1 การเชื่อมชิ้นยีน *PreS2+S* เข้ากับเวคเตอร์ pcDNA3.4

นำชิ้นยีน *PreS2+S* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *AgeI* ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาเชื่อมกับเวคเตอร์ pcDNA3.4 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *AgeI* ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วเช่นเดียวกัน ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligaseโดยคำนวณปริมาณชิ้นยีนที่จะใช้ในการเชื่อมกับเวคเตอร์ ดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

$$\frac{\text{ng of vector} \times \text{kb size of insert}}{\text{kb size of vector}} \times \frac{\text{insert}}{\text{vector}} \text{ molar ratio} = \text{ng of insert}$$

$$\frac{25 \text{ ng} \times 1 \text{ kb}}{6 \text{ kb}} \times \frac{5}{1} = 20.83 \text{ ng}$$

และเตรียมสารในการทำปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

| ส่วนประกอบ | ปริมาตร(µl) |
|---|---|
| 2X Rapid ligation buffer | 2.5 |
| pcDNA3.4 (~25 ng) | 0.8 |
| PCR product PreS2+S(20.83 ng/ µl) | 0.95 |
| T4 DNA ligase | 0.5 |
| Nuclease free water | 0.25 |
| รวม | 5.0 |

นำ reaction ที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

5.4.2 การเชื่อมชิ้นยีน *S* เข้ากับเวคเตอร์ pcDNA3.4

นำชิ้นยีน S ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *AgeI* แล้ว มาเชื่อมเข้ากับเวคเตอร์ pcDNA3.4 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *AgeI* เช่นเดียวกัน ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase โดยคำนวณปริมาณชิ้นยีนที่ต้องใช้ในการเชื่อมกับเวคเตอร์ดังนี้

$$\frac{\text{ng of vector} \times \text{kb size of insert}}{\text{kb size of vector}} \times \frac{\text{insert}}{\text{vector}} \text{ molar ratio} = \text{ng of insert}$$

$$\frac{25 \text{ ng} \times 0.8 \text{ kb}}{6 \text{ kb}} \times \frac{3}{1} = 10 \text{ ng of insert}$$

และทำการเตรียมสารในการทำปฏิกิริยาดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

| ส่วนประกอบ | ปริมาตร(µl) |
|---|---|
| 2X Rapid ligation buffer | 2.5 |
| pcDNA3.4 (~25 ng) | 1.5 |
| PCR product *S* (10ng/ µl) | 0.5 |
| T4 DNA ligase | 0.5 |
| รวม | 5.0 |

นำ reaction mixture ที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

5.5 การเตรียม Competent cells

5.5.1 ลงเชื้อ *E.coli* TOP10F' จาก glycerol stock culture ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในอาหาร SOB medium ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส โดยเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ประมาณ 3-4 ชั่วโมง จนกระทั่งค่าความเข้มของแสง (OD) ที่ 600 นาโนเมตร มีค่าประมาณ 0.5

5.5.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5.5.3 เทส่วนใสออก แล้วละลายตะกอนเซลล์เบาๆด้วย CCMB80 buffer ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ที่แช่เย็น

5.5.4 นำไปแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5.5.5 เทส่วนใสออก แล้วละลายตะกอนเซลล์เบาๆด้วย CCMB80 buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่แช่เย็น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.5.6 แบ่งตัวอย่างเชื้อปริมาตร 150 ไมโครลิตร มาผสมกับอาหาร SOC ปริมาตร600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปวัดค่าความเข้มแสง (OD) ที่ 600 นาโนเมตร โดยค่าที่ได้ควรอยู่ที่ประมาณ 1.0 - 1.5 (ถ้าเกินให้ปรับปริมาตรด้วยCCMB80 )

5.5.7 นำเชื้อที่ได้แช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 20 นาที แล้วแบ่งใส่หลอดๆละ 50 ไมโครลิตร ก่อนนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

5.6 การนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน โดยวิธี Heat shocktransformation

5.6.1 นำcompetent cells ที่เตรียมไว้มาตั้งไว้ให้ละลายในน้ำแข็ง

5.6.2 นำ ligated reaction ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เติมลงใน competentcellsปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้นิ้วดีดข้างหลอดเบาๆ

5.6.3 นำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วย้ายไปแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที แล้วนำกลับไปแช่ในน้ำแข็งทันที

5.6.4 เติม SOC medium ปริมาตร 250 ไมโครลิตรลงไป แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พร้อมกับเขย่าที่ความเร็ว250 รอบต่อนาที

5.6.5 นำเชื้อที่ได้มา spread บนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร 2XYT-AG agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

**7. การตรวจหาโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม pcDNA3.4 ที่มียีน *PreS2+S* และ *S* โดยวิธี colony PCR**

การเตรียมสารในการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจหาโคโลนีของเชื้อ *E.coli* ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม pcDNA3.4 ที่มียีน *PreS2+S* ดังนี้

| ส่วนประกอบ | ปริมาตร (µl) | ความเข้มข้น |
|---|---|---|
| 2XGoTaq®Green Master mix | 62.5 | 1X |
| 10 µm MuKleader2/2 HBsAgPreS2 forward primer | 1.25 | 0.1 µm |
| 10 µm pcDNA3.4 reverse primer | 1.25 | 0.1 µm |
| Nuclease free water | 60.0 | |
| รวม | 125.0 | |

การเตรียมสารในการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจหาโคโลนีของเชื้อ *E.coli* ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม pcDNA3.4 ที่มียีน *S* ดังนี้

| ส่วนประกอบ | ปริมาตร (µl) | ความเข้มข้น |
|---|---|---|
| 2XGoTaq®Green Master mix | 62.5 | 1X |
| 10 µm XbaIMuKleader forward primer | 1.25 | 0.1 µm |
| 10 µm pcDNA3.4 reverse primer | 1.25 | 0.1 µm |
| Nuclease free water | 60.0 | |
| รวม | 125.0 | |

จากนั้นแบ่ง reaction mixture ใส่หลอดๆละ 5 ไมโครลิตร ใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจิ้มโคโลนีเดี่ยวๆจากเพลท แล้วจุ่มลงใน reaction mixture ที่แบ่งไว้จากนั้นจึงนำไปทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermal cycler) ที่อุณหภูมิเริ่มต้น 95 เซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นหมุนเวียนอุณหภูมิ 3 ระดับที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตามด้วยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 25 รอบ และอุณหภูมิสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 นาที

จากนั้นนำ reaction mixture ไปตรวจสอบ PCR product โดยวิธี agarose gel electrophoresis เพื่อคัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม pcDNA 3.4 ที่มียีน *PreS2+S* และ *S* แทรกอยู่ จากนั้นนำโคโลนีของเชื้อที่มี PCR product มาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT-AG ปริมาตร 3 มิลลิลิตร โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสพร้อมกับเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อที่ได้มาสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุด GenCatch™Plasmid DNA Miniprep Kit

**8. การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสมที่ได้โดยวิธี Sanger's Sequencing**

8.1 การเตรียมสารในการทำปฏิกิริยาPCR Sequencing

| **ส่วนประกอบ** | **ปริมาตร(µl)** |
|---|---|
| 5X Sequence buffer | 1.0 |
| 10 µM primer | 0.5 |
| Bigdye®Terminator v3.1 | 2.0 |
| template DNA (400 ng) | 2.0 |
| Nuclease free water | 2.5 |
| รวม | 10.0 |

โดย primer ที่ใช้สำหรับพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *PreS2+S* คือ CMV forward และ pcDNA3.4 reverse ส่วน primer ที่ใช้สำหรับพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *S* คือ CMV forward

นำ reaction ที่ได้ไปทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermal cycler) ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นหมุนเวียนอุณหภูมิ 3 ระดับที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที ตามด้วยอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที จำนวนรอบ 25 รอบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8.2 การทำPCR product ให้มีความบริสุทธิ์

8.2.1 ถ่าย reaction mixture ที่ได้มาใส่ใน microtube จากนั้นเติม Bigdye® Cleaning Bead (BCB) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยใช้ปิเปตผสมให้เข้ากัน

8.2.2 เติม 85%ethanol ปริมาตร 41.54 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตก่อนนำไปวางบนแท่นแม่เหล็ก(magnetic stand) แล้วตั้งไว้เป็นเวลา 3 นาทีตัวอย่างจะแยกชั้นของส่วนใสกับตะกอนออกจากกัน

8.2.3 ปิเปตส่วนใสออกแล้วเติม 85%ethanol ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้30 วินาที จากนั้นดูดออกโดยไม่ต้องชะ bead แล้วทำซ้ำอีก 2 ครั้ง จากนั้นนำตะกอนไปตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 10 นาที

8.2.4 ชะดีเอ็นเอออกจาก bead ด้วย 1X Elution buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร โดยใช้ปิเปตขึ้นลง แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปวางบนแท่นแม่เหล็ก (magnetic stand) แล้วตั้งไว้เป็นเวลา 5นาที

8.2.5 ค่อยๆปิเปตส่วนใสออกมาปริมาตร 35 ไมโครลิตร ผสมกับ HiDiformamide ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ในหลอดใหม่โดยใช้ปิเปตผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ABI Prism$^{TM}$310 Genetic Analyzer

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

**9. การเตรียมพลาสมิดลูกผสมสำหรับการ Transfection**

หลังจากตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสมแล้ว จากนั้นคัดเลือกโคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกต้องมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT-AG ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง แล้วตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียโดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 6,000 x g เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำตะกอนเซลล์มาสกัดพลาสมิดด้วยชุด GenCatch™Plasmid DNA Midiprep Kit ดังนี้

9.1 เติม VP1 buffer ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เพื่อละลายตะกอน โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลง

9.2 เติม VP2 buffer ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียแตกโดยผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

9.3 เติม VP3 buffer ที่แช่เย็นปริมาตร 4 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ทิ้งที่ 20,000 x g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9.4 เตรียมคอลัมน์โดยเติม 98%ethanol ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วตั้งไว้ให้ไหลผ่านคอลัมน์จนหมดจากนั้นเติม VPN buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วตั้งไว้ให้ไหลผ่านคอลัมน์

9.5 นำส่วนใสจากตัวอย่างที่ปั่นแยกตะกอนทิ้งมาใส่ลงในคอลัมน์ แล้วตั้งไว้ให้ไหลผ่านคอลัมน์จนหมด แล้วจึงล้างคอลัมน์ด้วย VPN buffer ปริมาตร 15 มิลลิลิตร

9.6 ชะเอาพลาสมิดดีเอ็นเอออกจากคอลัมน์ด้วย VPE buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยเก็บส่วนใสที่ไหลผ่านคอลัมน์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

9.7 ตกตะกอนพลาสมิดดีเอ็นเอที่ชะออกมาโดยเติม isopropanol ปริมาตร 3.75 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 x g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9.8 ปิเปตส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนด้วย 70%ethanol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่15,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9.9 ปิเปตส่วนใสทิ้งให้หมดแล้วตากตะกอนพลาสมิดให้แห้งประมาณ 10 นาที จากนั้นเติม Nuclease free water ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้งานต่อไป

**10. การเตรียมเซลล์สำหรับการ Transfection**

10.1 นำ stock เซลล์ Expi 293F™ จำนวน $1\times10^6$เซลล์ ถ่ายลงใน Polystyleneflask ขนาด 125 มิลลิลิตรที่มีอาหาร Expi 293F™ Expression medium ปริมาตร30 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศ 8% $CO_2$ พร้อมกับเขย่าด้วยความเร็ว 145 รอบต่อนาทีจนกระทั่งเซลล์มีความหนาแน่นมากกว่า $1\times10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน

10.2 นับจำนวนเซลล์ด้วย haemacytometer โดยย้อมเซลล์ด้วยสี trypan blue ในอัตราส่วนปริมาณเซลล์ต่อปริมาณสี 1:9 ให้ได้ความหนาแน่น $3\times10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

10.3 ถ่ายเซลล์ลงในอาหารใหม่แล้วนำไปเพาะเลี้ยงต่อจนกระทั่งเวลามีความหนาแน่น $3 \times 10^6$ ถึง $5 \times 10^6$เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใช้เวลาประมาณ3- 4 วัน แล้วจึงถ่ายเซลล์ลงในอาหารใหม่อีกครั้ง ต่อเนื่องอย่างน้อย 5 passage

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

10.4 เมื่อเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่องมากกว่า 5 passage แล้วจึงถ่ายเซลล์ลงในอาหารใหม่ที่ความหนาแน่น 1x $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศ 8% $CO_2$ พร้อมกับเขย่าด้วยความเร็ว 145 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนการ Transfection

**11.การหาสภาวะที่เหมาะสมในการ Transfection**

11.1 เจือจางเซลล์ที่เตรียมไว้ในอาหาร Expi 293F™ Expression medium โดยให้เซลล์มีความหนาแน่น 2.5 x $10^6$ เซลล์ แล้วจึงแบ่งใส่ใน 24 wells cell culture plate หลุมละ 500 ไมโครลิตร

11.2 เตรียมพลาสมิดดีเอ็นเอ pGFP (พลาสมิดที่บรรจุยีนของโปรตีนเรืองแสง), pcDNA3.4/*PreS2+S* และ pcDNA3.4/*S* ตัวอย่างละ 6 ไมโครกรัมผสมกับ OptiPro™SFM ตัวอย่างละ 60 ไมโครลิตร แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

11.3 เตรียม GenCarrier-1™ transfection reagent ที่ปริมาณต่างๆ (0, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 μl) ใน OptiPro™SFM ตัวอย่างละ 10 ไมโครลิตร

11.4 นำพลาสมิดดีเอ็นเอแบ่งใส่ใน transfection reagent ที่เตรียมไว้หลอดละ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา20นาที เพื่อให้เกิดเป็น DNA - lipid complex

11.5 นำส่วนผสม DNA - lipid complex ที่ได้หยดลงในเซลล์ที่เตรียมไว้ในแต่ละหลุม เขย่าให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสภายใต้บรรยากาศ 8% $CO_2$ พร้อมกับเขย่าด้วยความเร็ว 145 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

11.5 เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด(GFP)ไปตรวจดูการเรืองแสงของโปรตีนภายในเซลล์ ภายใต้กล้อง Flourescent microscope ส่วนเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *PreS2+S* และ *S* ไปตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี ELISA จากนั้นวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนที่ transfection reagent ปริมาณต่างๆ

**12. การขยายขนาดการ Transfection**

12.1 เจือจางเซลล์ที่เตรียมได้ในอาหาร Expi 293F™ Expression medium ให้เซลล์มีจำนวน 2.5x $10^6$เซลล์ปริมาตร 30 มิลลิลิตร

12.2 เตรียมพลาสมิดลูกผสม pcDNA3.4/*PreS2+S* และ pcDNA3.4/*S* ตัวอย่างละ 25 ไมโครกรัมผสมกับOptiPro™SFMตัวอย่างละ 40 ไมโครลิตร แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

12.3 เตรียม GenCarrier-1™ transfection reagent ในปริมาณที่เหมาะสมจากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการ Transfection ผสมกับOptiPro™SFM ตัวอย่างละ40 ไมโครลิตร

12.4 นำพลาสมิดลูกผสม pcDNA3.4/*PreS2+S* และ pcDNA3.4/*S* หยดลงใน transfection reagent ที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากันตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้เกิดเป็น DNA - lipid complex

12.5 นำส่วนผสม DNA - lipid complex ที่ได้หยดลงในเซลล์ที่เตรียมไว้ เขย่าให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสภายใต้บรรยากาศ 8% $CO_2$ พร้อมกับเขย่าด้วยความเร็ว 145 รอบต่อนาที

12.6 เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงเพื่อใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของ HBsAg

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

**13. การตรวจสอบการแสดงออกของ HBsAg ด้วยวิธี ELISA**

หลังจากการนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แล้วทำการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์ที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ นำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 600 x g เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้มาตรวจสอบการแสดงออกของ HBsAg ด้วยวิธี ELISA ดังนี้

13.1 เคลือบเพลทด้วย Polyclonal antibody ต่อ HBsAg ที่เจือจางด้วย coating buffer ความเข้มข้น 20ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ4องศาเซลเซียส ข้ามคืน

13.2 ล้างเพลทด้วย PBS ปริมาตรหลุมละ 400 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้งๆละ 3 นาที

13.3 เติม blocking buffer (8%skim milk ใน PBS) ลงไปหลุมๆละ 400 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วย PBS อีก 3 ครั้งๆละ 3 นาที

13.4 เติมตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์ลงไปหลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

13.5 ล้างเพลทด้วย PBS-T (0.05%Tween ใน PBS) ปริมาตรหลุมละ 400 ไมโครลิตร จำนวน3 ครั้งๆละ 3 นาที และ PBS 1 ครั้งเป็นเวลา 3 นาที

13.6 เติมMonoclonal antibody ต่อ HBsAgที่ติดฉลากด้วย HRP โดยเจือจางใน blocking solution ที่มีความเข้มข้น 10 μg/ml ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

13.7ล้างเพลทด้วย PBS-T (0.05%Tween ใน PBS) ปริมาตรหลุมละ 400 ไมโครลิตร จำนวน4ครั้งๆละ 3 นาที และ PBS 1 ครั้งเป็นเวลา 3 นาที

13.8เติม TMB peroxidase ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วนำเพลทไปบ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

13.9 หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1%HCl ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

**14. การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี IFA**

หลังจากนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แล้วเก็บตัวอย่างเซลล์ที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงมาตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี IFA ดังนี้

14.1 เตรียมเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 600 xg เป็นเวลา 5 นาที

14.2 ปิเปตส่วนใสทิ้งแล้วล้างเซลล์ด้วย PBS ที่กรองด้วย filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 600 x g เป็นเวลา 5 นาที

14.3 ปิเปตส่วนใสทิ้งแล้วเติม PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้นิ้วดีดหลอดเบาๆ

14.4 หยดตัวอย่างเซลล์ลงบนแผ่นสไลด์หลุมละ 2 ไมโครลิตร แล้วเกลี่ยให้เต็มวงกลม จากนั้นนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ให้ได้ปริมาณเซลล์ที่พอเหมาะ

14.5 รอจนสไลด์แห้งแล้วเติม 40%methanol ใน acetone ลงไปเพื่อให้ตัวอย่างเซลล์ยึดติดกับแผ่นสไลด์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

14.6 ล้าง methanol ออกด้วย PBS จำนวน 2 ครั้งๆละ 5 นาที และซับให้แห้ง

14.7 เติมmonoclonal antibody ต่อ HBsAg ที่เจือจางกับ PBS ในอัตราส่วน 1:500 โดยหยดลงหลุมๆละ 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

14.8 ล้างสไลด์ด้วย PBS จำนวน 2 ครั้งๆละ 5 นาที และซับให้แห้ง

14.9 เติม Anti-Mouse Immunoglobulins/Alexa ซึ่งติดฉลากด้วยสารเรืองแสง Alexa ที่เจือจางกับ PBS ในอัตราส่วน 1:500 โดยหยดลงหลุมๆละ 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที

14.10 ล้างสไลด์ด้วย PBS จำนวน 3 ครั้งๆละ 5 นาที และซับให้แห้ง จากนั้นปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วนำไปส่องดูการเรืองแสงภายใต้กล้อง Fluorescent microscope เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับพลาสมิดลูกผสมเข้าไป

**15. การแยกโปรตีนด้วยวิธี Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)**

การทำ SDS-PAGE เป็นวิธีที่ช่วยในการแยกหน่วยย่อยของโปรตีนที่มีน้ำหนักต่างกันออกจากกัน ก่อนที่จะถ่ายโอนลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส เพื่อดูความจำเพาะของโปรตีนด้วยวิธี western blot analysis โดยใช้ชุด gel electrophoresis แบบ slab gel (Miniprotein II cell, Biorad)

การแยกหน่วยย่อยของโปรตีน HBsAgในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นของ acrylamide 4% และ 12% ในส่วนของ stacking gel และ separating gel ตามลำดับ

15.1 การเตรียม slab gel

15.1.1 ประกอบชุดกระจกแก้วสำหรับทำ slab gel ใช้ spacers เป็นตัวปรับความหนาของ gel ทำในแนวระนาบที่เสมอกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

15.1.2 เตรียมส่วนผสมของ separating gel ปริมาณ 10 มิลลิลิตร โดยผสมสารต่างๆ ตามภาคผนวกเข้าด้วยกัน ยกเว้น ammoniompersulphate (APS)และ N,N,N',N'-tetramethyl ethylene diamine(TEMED)

15.1.3 ค่อยๆเติม APS และ TEMED ลงไป จากนั้นใช้ Pasteur pipette ดูดส่วนผสมนี้ลงไปในช่องระหว่างกระจกแก้วที่เตรียมไว้ โดยให้ต่ำกว่าขอบกระจกประมาณ 2.5 เซนติเมตร สำหรับเติม stacking gel จากนั้นค่อยๆเติม isopropanol alcohol คลุมผิวหน้าเจลไว้ รอจนกระทั่งเจลแข็งตัว ใช้เวลาประมาณ 30-45 นาที ซึ่งจะสังเกตจากรอยต่อระหว่างผิวหน้าเจลและ isopropanol alcoholที่คลุมผิวหน้าเจลเอาไว้

15.1.4 เตรียมส่วนผสม stacking gel ประมาณ 5 ml (ตามภาคผนวก) เข้าด้วยกัน ยกเว้น APS และ TEMED

15.1.5 เทส่วน isopropanol alcohol ที่คลุมผิวเจลออก ล้างผิวหน้าเจลด้วยน้ำกลั่น ซับผิวหน้าเจลให้แห้ง

15.1.6 เติม APS และ TEMED ลงในส่วนผสมของ stacking gel ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงบน separating gel พยายามไม่ให้มีฟองอากาศเกิดในช่องของ comb จากนั้นค่อยๆสอด comb ลงในgel plate ทิ้งให้เจลแข็งตัวโดยจะใช้เวลาประมาณ 30-45 นาที

15.2 การเตรียมสารตัวอย่างเพื่อทำ electrophoresis

15.2.1 นำตัวอย่างน้ำเลี้ยงเซลล์และ cell lysate ผสมกับ sample buffer ในอัตราส่วน 1:4 (โดยทั่วไปแล้วปริมาตรของสารตัวอย่างที่จะหยอดใส่ในเจลจะอยู่ในช่วง 15-20 µl) ต้มสารละลายผสมนี้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา3นาที ก่อนนำไปหยอดลงในช่องเจล

15.2.2 หยอดโปรตีนมาตรฐานสำหรับใช้เทียบหาน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่าง ซึ่งในการทดลองนี้จะใช้ broad range (Bio-rad ,USA) ซึ่งสามารถใช้ได้เลยไม่ต้องผ่านการต้ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

15.3 การทำelectrophoresis

15.3.1 ต่อชุด electrophoresis ทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม electrophoresis buffer ลงใน chamber

15.3.2 ค่อยๆดึง comb ออกจาก stacking gel ในแนวตรงๆฉีดล้างช่องเจลด้วยน้ำกลั่น เพื่อดูดเอาเศษเจลที่เหลือออกให้หมด

15.3.3 ใช้ปิเปตค่อยๆหยอดสารตัวอย่างที่เตรียมไว้ พร้อมกับโปรตีนมารฐานลงในช่องเจล ปริมาตร 15-20 µl

15.3.4 ปิดฝา chamber แล้วต่อสายไฟขั้วบวกและลบเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 200 โวลต์ จะใช้เวลาประมาณ 45-60 นาที อาจจะสังเกตได้จากสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่มาถึงห่างจากปลายข้างล่างของเจล1 เซนติเมตร

**16. การศึกษาความจำเพาะของโปรตีนด้วยวิธี Western blot analysis**

Western blot analysis เป็นการทดสอบปฏิกิริยาของโปรตีนกับ anti-HBsAg polyclonal antibody ภายหลังจากการแยกขนาดของโปรตีนด้วย SDS-PAGE และถ่ายลงแผ่นไนโตเซลลูโลส โดยมีขั้นตอนดังนี้

16.1 ตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลส 0.45 µm (BA85, Schleicher &Schuell) ขนาดกว้าง 5 เซนติเมตร ยาว 8 เซนติเมตร และตัดกระดาษกรอง whatman (no.3) ขนาดกว้าง 7 เซนติเมตร ยาว10 เซนติเมตร แช่ใน blotting buffer รวมทั้งฟองน้ำ (filter pad)

16.2 นำเจลที่ผ่านการทำ SDS-PAGE ตัดส่วนที่เป็น stacking gel ออกไปวางทับบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสพยายามไม่ให้มีฟองอากาศแทรกอยู่ระหว่างไนโตรเซลลูโลสกับเจล ปิดทับหน้าเจลด้วยกระดาษกรอง 1 แผ่น และด้านไนโตรเซลลูโลสอีก 1 แผ่น นำ filter pad วางประกบหน้าหลังอีกหนึ่งชั้น นำไปวางบน cassette ปิด cassette ให้สนิท

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

16.3 นำชุด cassette นี้ใส่ลงใน chamber ซึ่งมี blotting buffer (ควรท่วม cassette) ปิดฝา chamber ต่อขั้วไฟฟ้าให้ตรงกับขั้วของเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 14 โวลต์ นาน 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4° องศาเซลเซียส

16.4 เมื่อครบเวลา นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสออกจาก cassette มาแช่ในblocking solution (3%skim milk ใน PBS) ให้ท่วม นำไป rotate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS-T 4 ครั้งๆละ 5 นาที

16.5 เติม anti-HBsAg polyclonal antibody ที่เจือจาง 1:5000 ด้วย PBS นำไป rotate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS 4 ครั้งๆละ 5 นาทีและล้างด้วย PBS 1 ครั้ง

16.6 เติมanti - rabbit HRP ที่เจือจาง 1:2000 ด้วย PBS นำไป rotate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS-T 4 ครั้งๆละ 5 นาทีและล้างด้วย PBS 1 ครั้ง

16.6 เติม TMB peroxidase จากนั้นเขย่าบๆจนกว่าจะเห็นปฏิกิริยาเกิดขึ้นคือจะเห็นเป็นลักษณะแถบสีม่วง แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น

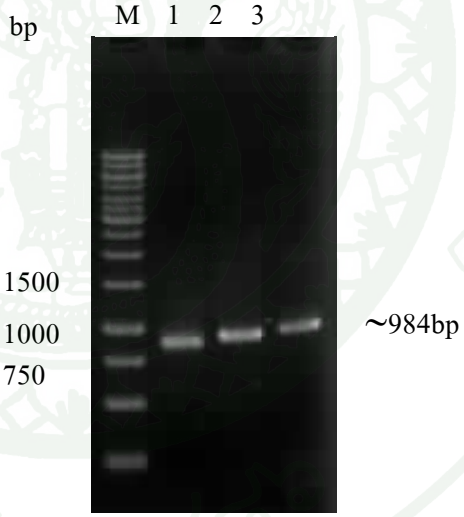
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

# ผลและวิจารณ์

## ผล

### 1. ผลการเพิ่มปริมาณยีน *PreS2+S* และ *S* จากตัวอย่าง

จากการเพิ่มปริมาณยีน *PreS2+S* จากตัวอย่างพลาสมิดด้วยเทคนิค Primer extension PCR และนำมาตรวจสอบขนาดชิ้นยีนที่ได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าชิ้นยีน *PreS2+S* ขนาด 876 คู่เบส และมีขนาดเพิ่มขึ้นเป็น 930 คู่เบส เมื่อมีการเติมส่วน srcretory signal sequence /Streptag sequence และมีขนาดเพิ่มขึ้นเป็น 984 คู่เบส เมื่อมีการเติมส่วน Kozackcocensus sequence / restriction size ดังแสดงในภาพที่ 7




**ภาพที่ 7** ผลการเพิ่มปริมาณยีน *PreS2+S*

M = Marker 1000 คู่เบส(GeneRuler™1kb Ladder, Fermentas)

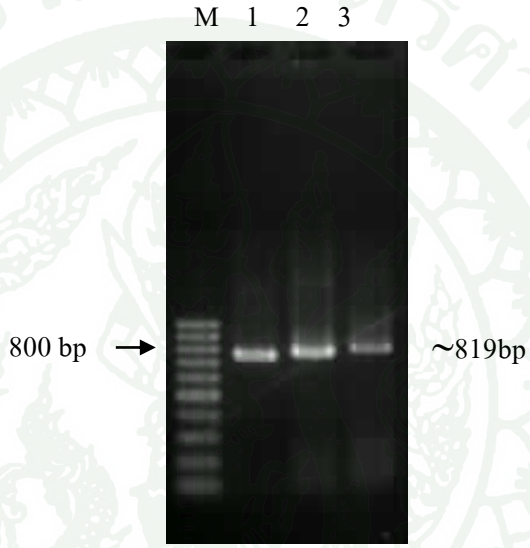
Lane 1 = PCR product ของยีน *PreS2+S*

Lane 2 = PCR product ของยีน *PreS2+S* ที่มีการเติมส่วน srcretory signal sequence และ Streptag sequence

Lane 3 = PCR product ของยีน *PreS2+S* ที่มีการเติมส่วน kozakconcensus sequenceและ restriction site

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากการเพิ่มปริมาณยีน *S* จากตัวอย่างพลาสมิดด้วยเทคนิค PCR และนำมาตรวจสอบขนาดชิ้นยีนที่ได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานพบว่าชิ้นยีน *S* มีขนาด 711 คู่เบส และมีขนาดเพิ่มขึ้นเป็น 965 คู่เบส เมื่อมีการเติมส่วน srcretory signal sequence /Streptag sequence และมีขนาดเพิ่มขึ้นเป็น 819 คู่เบส เมื่อมีการเติมส่วน Kozackcocensus sequence / restriction size ดังแสดงในภาพที่ 8




**ภาพที่ 8** ผลการเพิ่มปริมาณยีน *S*

M = Marker 100 คู่เบส(GeneRuler™100bp Ladder, Fermentas)

Lane 1 = PCR product ของยีน*S*

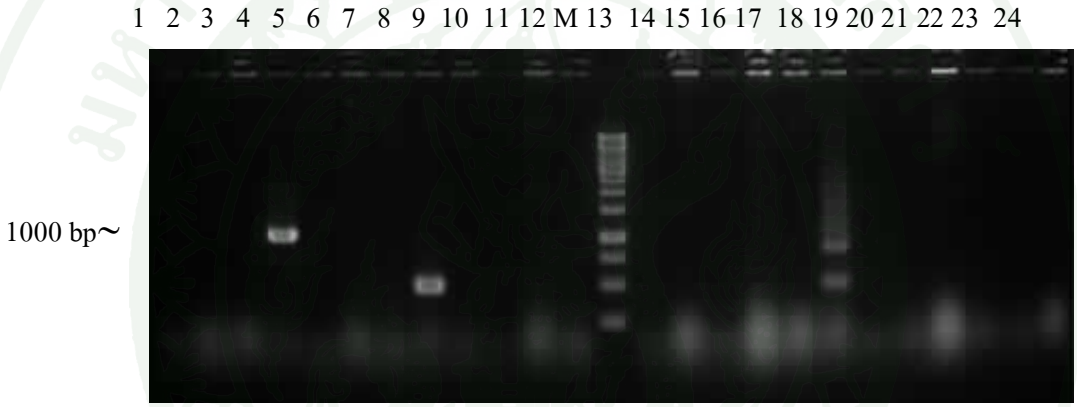
Lane 2 = PCR product ของยีน*S*ที่มีการเติมส่วน srcretory signal sequence และ Streptag sequence

Lane 3 = PCR productของยีน*S*ที่มีการเติมส่วน kozakconcensus sequenceและ restriction site

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

**2. ผลการตรวจหาโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม pcDNA3.4 ที่มียีน *PreS2+S* และยีน S โดยวิธี colony PCR**

การทดลองนี้ใช้ดีเอ็นเอพาหะ (vector) pcDNA 3.4 ที่มีขนาด 6 Kb โดยเตรียมจากการตัดด้วยเอนไซม์ *XbaI* และ *AgeI* ใช้เอนไซม์ไลเกสในการเชื่อมต่อเข้ากับยีน *PreS2+S* และ *S* ของไวรัสตับอักเสบบีที่มีปลายเหนียวเช่นเดียวกันทำให้ได้พลาสมิดลูกผสม pcDNA3.4 ที่มียีน *PreS2+S* และ *S* ของไวรัสตับอักเสบบีแทรกอยู่ด้วยผลจากการตรวจหาโคลนที่ให้ผลบวก ด้วยวิธี colony PCR โดยใช้ primer vector พบว่า PCR product มีขนาดประมาณ 1 Kb ดังแสดงในภาพที่ 9 และ 10



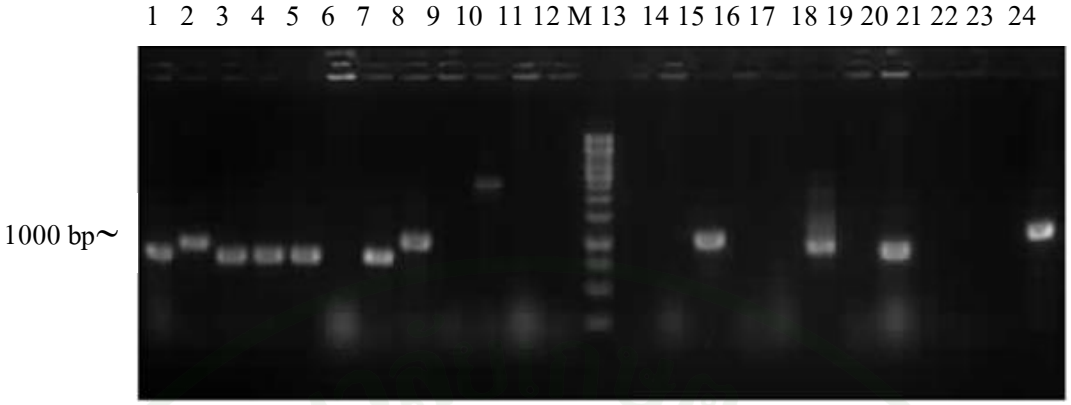

**ภาพที่ 9** ผลการคัดเลือกพลาสมิดลูกผสม pcDNA3.4 ที่มียีน *PreS2+S* โดยวิธี colony PCR

M = Marker 1Kb (GeneRuler™1kb Ladder, Fermentas)

1-24 = PCR product จากการทำ colony PCR โคโลนี 1-24 ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่าได้พลาสมิดลูกผสม pcDNA3.4 ที่มียีน *PreS2+S* ให้โคลนที่เป็นผลบวกเพียง 1 โคลนเท่านั้น อาจเกิดจากขนาดของพลาสมิดลูกผสมที่มีขนาดใหญ่ทำให้โอกาสเกิด recombinant clone ได้ยาก จากนั้นเลือก 1 โคลนที่ได้นี้ไปตรวจสอบหาความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger's Sequencing ต่อไป โดยใช้ CMV Forward และ pcDNA3.4 reverse เป็น sequencing primer

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์




**ภาพที่ 10** ผลการคัดเลือกพลาสมิดลูกผสม pcDNA3.4 ที่มียีน *S* โดยวิธี colony PCR

M = Marker 1Kb (GeneRuler™1kb Ladder, Fermentas)

1-24 = PCR productจากการทำ colony PCR โคโลนี1-24 ตามลำดับ

จากการทดลองพบว่าได้พลาสมิดลูกผสม pcDNA3.4 ที่มียีน *S* ให้โคลนที่เป็นผลบวก 5 โคลน ดังนั้นจึงเลือก 5 โคลนที่ได้นี้ไปตรวจสอบหาความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger's Sequencing ต่อไปโดยใช้ CMV Forward และ pcDNA3.4 reverse เป็นsequencing primer

**3.ผลการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดลูกผสมที่ได้โดยวิธี Sanger's Sequencing**

หลังจากได้พลาสมิดลูกผสม pcDNA3.4 ที่มียีน *PreS2+S* และยีน *S* โคลนที่ให้ผลบวกแล้ว นำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI Prism™310 Genetic Analyzer นำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีนกับฐานข้อมูล NCBI พบว่าชิ้นยีน *PreS2+S* ในพลาสมิดลูกผสม pcDNA3.4/*PreS2+S* โคลน 4 และยีน *S* ในพลาสมิดลูกผสม pcDNA3.4/*S* โคลน 2 มีการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ในทิศทางที่ถูกต้อง และ homology กับยีนจาก HBsAg จากฐานข้อมูล NCBI มากกว่า 90% แสดงดังภาพที่ 11 และ 12 ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
gi|157091222|gb|EU093916.1      ------------------------------------------------
pcDNA3.4/PreS2/s clone 4        GACTCTAGAGGATCGAACCCTGCCGCCACCATGGAGACAGACACACTCCT 50

gi|157091222|gb|EU093916.1      ----------------------------------------ATGCAGTGGA 10
pcDNA3.4/Pres2/s clone 4        GCTTTGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCCACGGCATGCAGTGGA 100
                                                                       **********

gi|157091222|gb|EU093916.1      ACTCCACAACATTCCACCAGGCTCTACTAGACCCCAGAGTGAGGGGCCTA 60
pcDNA3.4/Pres2/s clone 4        ACTCCAGCACATTCCACCAAGCTCTGCTAGATCCCAGAGTGAGGGGCCTA 150
                                ******  *********** ***** ***** ******************

gi|157091222|gb|EU093916.1      TACTTTCCTGCTGGTGGCTCCAGTTCCGGAACAGTAAACCCTGTTCCGAC 110
pcDNA3.4/Pres2/s clone 4        TACTTTCCTGCTGGTGGCTCAAGTTCCGGAACAGTAAACCCTGTTCCGAC 200
                                ******************* ******************************

gi|157091222|gb|EU093916.1      TACTGCCTCACCCATATCGTCAATCTTCTCGAGGACTGGGGACCCTGCAC 160
pcDNA3.4/Pres2/s clone 4        TACTGCCTCTCCCATATCGTCAATCTTCTCGAGGACTGGGGACCCTGCAC 250
                                ********* ****************************************

gi|157091222|gb|EU093916.1      CGAACATGGAGAACACAACATCAGGATTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTTA 210
pcDNA3.4/Pres2/s clone 4        CGAACATGGAGAGCACCACATCAGGATTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTTA 300
                                ************ *** ***********************************

gi|157091222|gb|EU093916.1      CAGGCGGGGTTTTTCTTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCACAGAGTCT 260
pcDNA3.4/Pres2/s clone 4        CAGGCGGGGTTTTTCTTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCACAGAGTCT 350
                                **************************************************

gi|157091222|gb|EU093916.1      AGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTCTAGGGGGAGCACCCACGTGTC 310
pcDNA3.4/Pres2/s clone 4        AGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTCTAGGGGGAGCACCCACGTGTC 400
                                **************************************************

gi|157091222|gb|EU093916.1      CTGGCCAAAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCAACCTCTTGT 360
pcDNA3.4/Pres2/s clone 4        CTGGCCAAAATTTGCAGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCAACCTCTTGT 450
                                ************ ***************************************

gi|157091222|gb|EU093916.1      CCTCCAATTTGTCCTGGCTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCAT 410
pcDNA3.4/Pres2/s clone 4        CCTCCAATTTGTCCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCAT 500
                                ***************** ******************************

gi|157091222|gb|EU093916.1      ATTCCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTTGGTTCTTCTGG 460
pcDNA3.4/Pres2/s clone 4        CTTCCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTTGGTTCTTCTGG 550
                                 **************************************************

gi|157091222|gb|EU093916.1      ACTACCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCCTCTACTTCCAGGAACATCAACT 510
pcDNA3.4/Pres2/s clone 4        ACTACCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCCTCTACTTCCAGGAACATCAACT 600
                                **************************************************

gi|157091222|gb|EU093916.1      ACCAGCACGGGACCATGCAAGACCTGCACGATTCCTGCTCAAGGAACCTC 560
pcDNA3.4/Pres2/s clone 4        ACCAGCACGGGACCATGCAAGACCTGCACGATTCCTGCTCAAGGAACCTC 650
                                **************************************************

gi|157091222|gb|EU093916.1      TATGTTTCCCTCTTGTTGCTGTACAAAACCTTCGGACGGAAACTGCACTT 610
pcDNA3.4/Pres2/s clone 4        TATGTTTCCCTCTTGTTGCTGTACAAAACCTTCGGACGGAAATTGCACTT 700
                                ****************************************** *******

gi|157091222|gb|EU093916.1      GTATTCCCATCCCATCATCCTGGGCTTTCGCAAGATTCCTATGGGAGTGG 660
pcDNA3.4/Pres2/s clone 4        GTATTCCCATCCCATCATCTTGGGCTTTCGCAAGATTCCTATGGGAGTGG 750
                                ****************** ******************************

gi|157091222|gb|EU093916.1      GCCTCAGTCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTCAGTG 710
pcDNA3.4/Pres2/s clone 4        GCCTCAGTCCGTTTCTCCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTCAGTG 800
                                **************************************************

gi|157091222|gb|EU093916.1      GTTCGTAGGGCTTTCCCCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGT 760
pcDNA3.4/Pres2/s clone 4        GTTCGTAGGGCTTTCCCCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGT 850
                                **************************************************

gi|157091222|gb|EU093916.1      GGTATTGGGGGCCAAGTCTGTACAACATCTTGAGTCCCTTTTTACCTCTA 810
pcDNA3.4/Pres2/s clone 4        GGTATTGGGGGCCAAGTCTGTACAACATCTTGAATCCCTTTTTACCTCTA 900
                                ********************************** ***************

gi|157091222|gb|EU093916.1      TTACCAATTTTCTTTTGTCTTTGGGTATACATTTGA-------------- 846
pcDNA3.4/Pres2/s clone 4        TTACCAATTTTCTTTTGTCTTTGGGTATACATTTGGTCCCACCCTCAATT 950
                                ***********************************

gi|157091222|gb|EU093916.1      ----------------------------------
pcDNA3.4/Pres2/s clone 4        CGAAAAGTGAAAGGGTTCGATCCCTACCGGTTAG 984
```

**ภาพที่ 11** ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวลีโอไทด์ของ pcDNA3.4/*PreS2+S*โคลน 4 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HBsAg จากฐานข้อมูล NCBI

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

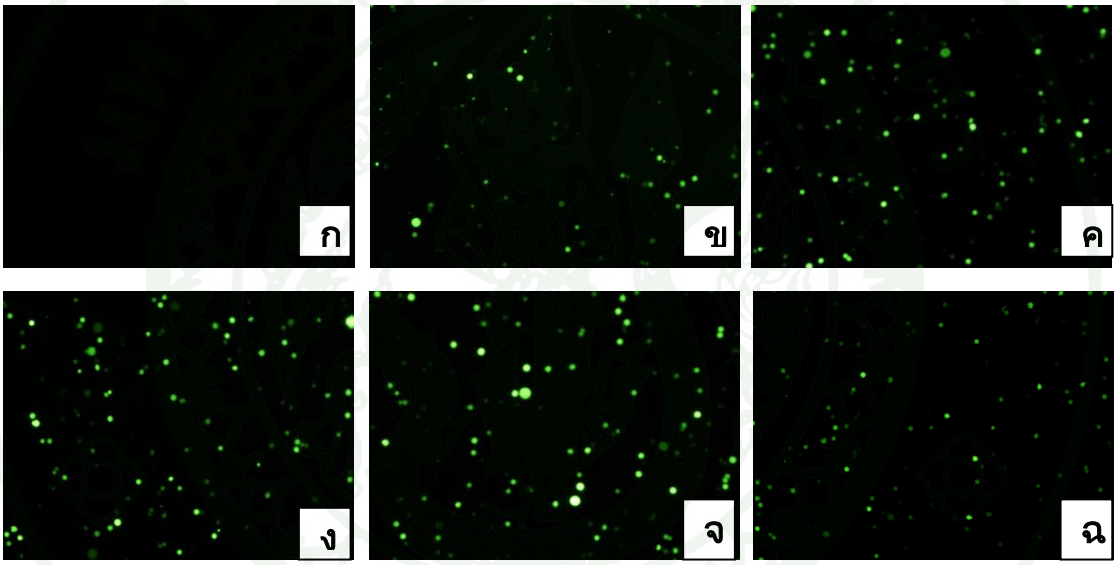
```
gi|157091222|gb|EU093916.1      ------------------------------------------------
pcDNA3.4/S clone 2              GACTCTAGAGGATCGAACCCTGCCGCCACCATGGAGACAGACACACTCCT 50

gi|157091222|gb|EU093916.1      ----------------------------------------ATGGAGAACA 10
pcDNA3.4/S clone 2              GCTTTGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCCACGGCATGGAGAACA 100
                                                                      **********

gi|157091222|gb|EU093916.1      CAACATCAGGATTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTTACAGGCGGGGTTTTTC 60
pcDNA3.4/S clone 2              CAACATCAGGATTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTTACAGGCGGGGTTTTTC 150
                                **************************************************

gi|157091222|gb|EU093916.1      TTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGAC 110
pcDNA3.4/S clone 2              TTGTTGACAAGAATCCTCACAATACCACAGAGTCTAGACTCGTGGTGGAC 200
                                **************************************************

gi|157091222|gb|EU093916.1      TTCTCTCAATTTTCTAGGGGGAGCACCCACGTGTCCTGGCCAAAATTCGC 160
pcDNA3.4/S clone 2              TTCTCTCAATTTTCTAGGGGGAGCACCCACGTGTCCTGGCCAAAATTTGC 250
                                ********************************************** **

gi|157091222|gb|EU093916.1      AGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCAACCTCTTGTCCTCCAATTTGTCCT 210
pcDNA3.4/S clone 2              AGTCCCCAACCTCCAATCACTCACCAACCTCTTGTCCTCCAATTTGTCCT 300
                                **************************************************

gi|157091222|gb|EU093916.1      GGCTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATATTCCTCTTCATCCT 260
pcDNA3.4/S clone 2              GGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATCTTCCTCTTCATCCT 350
                                ** ******************************** **************

gi|157091222|gb|EU093916.1      GCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTTGGTTCTTCTGGACTACCAAGGTATGT 310
pcDNA3.4/S clone 2              GCTGCTATGCCTCATCTTCTTGTTGGTTCTTCTGGACTACCAAGGTATGT 400
                                **************************************************

gi|157091222|gb|EU093916.1      TGCCCGTTTGTCCTCTACTTCCAGGAACATCAACTACCAGCACGGGACCA 360
pcDNA3.4/S clone 2              TGCCCGTTTGTCCTCTACTTCCAGGAACATCAACTACCAGCACGGGACCA 450
                                **************************************************

gi|157091222|gb|EU093916.1      TGCAAGACCTGCACGATTCCTGCTCAAGGAACCTCTATGTTTCCCTCTTG 410
pcDNA3.4/S clone 2              TGCAAGACCTGCACGATTCCTGCTCAAGGAACCTCTATGTTTCCCTCTTG 500
                                **************************************************

gi|157091222|gb|EU093916.1      TTGCTGTACAAAACCTTCGGACGGAAACTGCACTTGTATTCCCATCCCAT 460
pcDNA3.4/S clone 2              TTGCTGTACAAAACCTTCGGACGGAAATTGCACTTGTATTCCCATCCCAT 550
                                ************************** **********************

gi|157091222|gb|EU093916.1      CATCCTGGGCTTTCGCAAGATTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTC 510
pcDNA3.4/S clone 2              CATCTTGGGCTTTCGCAAGATTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTC 600
                                **** ******************************************

gi|157091222|gb|EU093916.1      TCCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTC 560
pcDNA3.4/S clone 2              TCCTGGCTCAGTTTACTAGTGCCATTTGTTCAGTGGTTCGTAGGGCTTTC 650
                                **************************************************

gi|157091222|gb|EU093916.1      CCCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAA 610
pcDNA3.4/S clone 2              CCCCACTGTTTGGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGGTATTGGGGGCCAA 700
                                **************************************************

gi|157091222|gb|EU093916.1      GTCTGTACAACATCTTGAGTCCCTTTTTACCTCTATTACCAATTTTCTTT 660
pcDNA3.4/S clone 2              GTCTGTACAACATCTTGAGTCCCTTTTTACCTCTATTACCAATTTTCTTT 750
                                **************************************************

gi|157091222|gb|EU093916.1      TGTCTTTGGGTATACATTTGA----------------------------- 681
pcDNA3.4/S clone 2              TGTCTTTGGGTATACATTTGGTCCCACCCTCAATTCGAAAAGTGAAAGGG 800
                                ********************

gi|157091222|gb|EU093916.1      -------------------
pcDNA3.4/S clone 2              TTCGATCCCTACCGGTTAG 819
```

**ภาพที่ 12** ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวลีโอไทด์ของ pcDNA3.4/*S*โคลน 2 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HBsAg จากฐานข้อมูล NCBI

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

**4. ผลการหา Transfection efficiency ที่เหมาะสม**

ในการทดลองใช้พลาสมิดที่บรรจุยีนของโปรตีนเรืองแสง (GFP) ที่ 1µg กับ GenCarrier-1™ transfection reagent ที่ปริมาณต่างๆ (0, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 µl) เข้าสู่เซลล์ Expi293F™ cell เมื่อดูการเรืองแสงของโปรตีน GFP ภายในเซลล์ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์หลังจากเลี้ยงเซลล์ผ่านไป 24 ชั่วโมง พบว่าในปริมาณเซลล์ที่เท่ากันปริมาณ GenCarrier-1™ transfection reagent (0, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 µl) มีการเรืองแสงหรือแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ใกล้เคียงกันเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติที่ไม่ได้รับพลาสมิดที่บรรจุยีนของโปรตีนเรืองแสงเข้าไปผลแสดงดังภาพที่ 13




**ภาพที่ 13** แสดงลักษณะเซลล์ Expi293F™ cell ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์

ก. ปริมาณ GenCarrier-1™ transfection reagent0 µl

ข. ปริมาณ GenCarrier-1™ transfection reagent1 µl

ค. ปริมาณ GenCarrier-1™ transfection reagent1.5µl

ง. ปริมาณ GenCarrier-1™ transfection reagent 2 µl

จ. ปริมาณ GenCarrier-1™ transfection reagent2.5 µl

ฉ. ปริมาณ GenCarrier-1™ transfection reagent3 µl

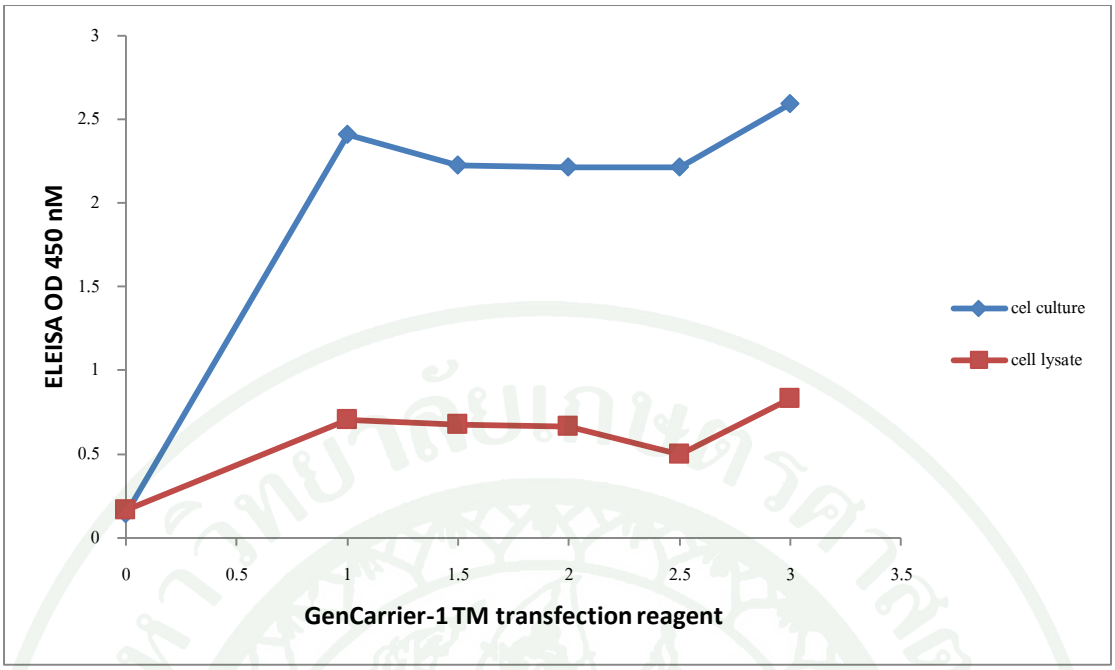
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อเปรียบเทียบการใช้พลาสมิดลูกผสมที่มียีน *PreS2+S* กับ GenCarrier-1™ transfection reagent ที่ปริมาณต่างๆ (0, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3µl) หลังการเลี้ยงเซลล์ 24 ชั่วโมง แล้วนำน้ำเลี้ยงเซลล์ไปตรวจสอบด้วยวิธี ELISA พบว่าที่ปริมาณ GenCarrier-1™ transfection reagent3 µl ให้ค่าสูงที่สุด ผลแสดงดังตารางที่ 2 และภาพที่ 14

**ตารางที่ 2** ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการ Transfectionโดยใช้พลาสมิดลูกผสมที่มียีน *PreS2+S* จากน้ำเลี้ยงเซลล์ Expi293F™ cell โดยวิธี ELISA

| | ค่า Absorbance 450 nm | |
|---|---|---|
| ปริมาณ GenCarrier-1™ transfection reagent | น้ำเลี้ยงเซลล์ | cell lysate |
| 0 µl | 0.139 | 0.166 |
| 1 µl | 2.409 | 0.705 |
| 1.5 µl | 2.226 | 0.674 |
| 2 µl | 2.217 | 0.666 |
| 2.5 µl | 2.214 | 0.496 |
| 3 µl | 2.595 | 0.828 |
| Blank | 0.110 | |

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์




**ภาพที่ 14** ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการ Transfection โดยใช้พลาสมิดลูกผสมที่มียีน *PreS2+S* จากน้ำเลี้ยงเซลล์ Expi293F™ cell โดยวิธี ELISA

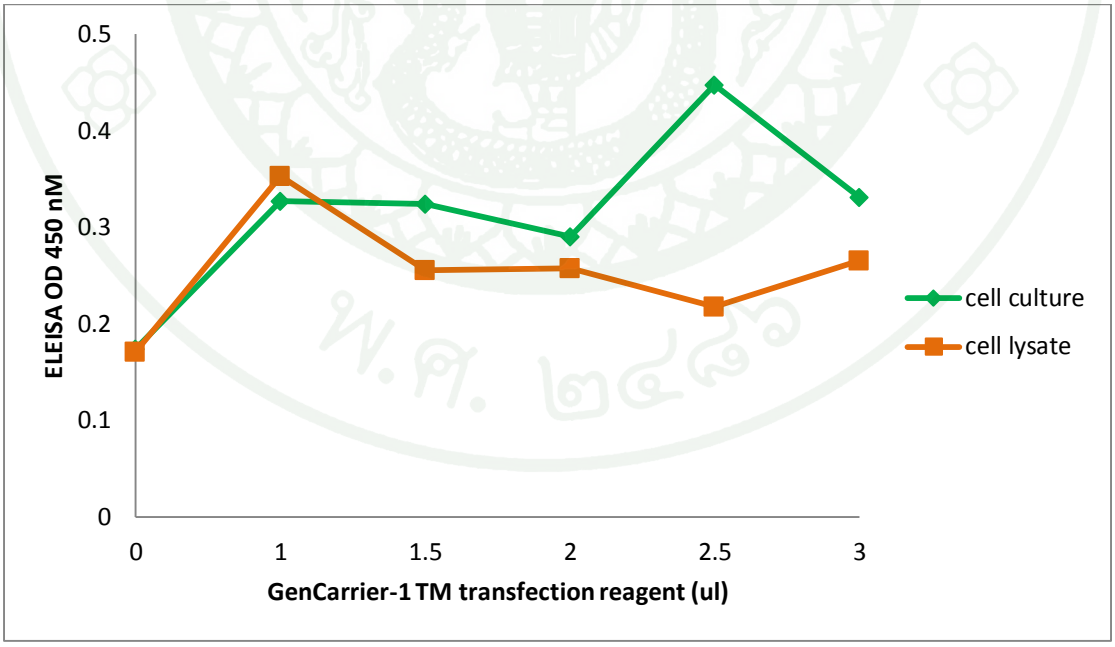
จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้ปริมาณ GenCarrier-1™ transfection reagent มากขึ้นค่าจะให้ค่า Absorbance 450 นาโนเมตร ผลที่ได้ไม่แตกต่างกันมากโดยค่าที่สูงและชัดเจนที่สุดอยู่ที่ปริมาณ GenCarrier-1™ transfection reagent 3 µl ซึ่งเหมาะที่จะนำไปใช้ในการเพิ่มขนาดการ Transfection แต่ที่ปริมาณ GenCarrier-1™ transfection reagent 1 µl ก็ให้ค่าที่น้อยกว่าเพียงเล็กน้อย หากต้องใช้ Transfection ในปริมาณที่มากจึงควรเลือกที่ปริมาณ GenCarrier-1™ transfection reagent 1 µl แทน เพื่อเป็นการประหยัด GenCarrier-1™ transfection reagent แต่ผลที่ได้ยังคงสูงและชัดเจนอยู่

เมื่อเปรียบเทียบการใช้พลาสมิดลูกผสมที่มียีน *S* กับ GenCarrier-1™ transfection reagent ที่ปริมาณต่างๆ (0, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3µl) หลังการเลี้ยงเซลล์ 24 ชั่วโมง แล้วนำน้ำเลี้ยงเซลล์ไปตรวจสอบด้วยวิธี ELISA พบว่าที่ปริมาณ GenCarrier-1™ transfection reagent 2.5 µl ให้ค่าสูงที่สุด ผลแสดงดังตารางที่ 3 และภาพที่ 15

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

**ตารางที่ 3** ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการ Transfectionโดยใช้พลาสมิดลูกผสมที่มียีน *S* จากน้ำเลี้ยงเซลล์ Expi293F™ cell โดยวิธี ELISA

| | ค่า Absorbance450 nm | |
|---|---|---|
| ปริมาณ GenCarrier-1™ transfection reagent | น้ำเลี้ยงเซลล์ | cell lysate |
| 0 µl | 0.174 | 0.171 |
| 1 µl | 0.327 | 0.353 |
| 1.5 µl | 0.324 | 0.256 |
| 2 µl | 0.290 | 0.258 |
| 2.5 µl | 0.447 | 0.218 |
| 3 µl | 0.331 | 0.266 |
| Blank | 0.140 | |




**ภาพที่ 15** ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการ Transfectionโดยใช้พลาสมิดลูกผสมที่มียีน *S* จากน้ำเลี้ยงเซลล์ Expi293F™ cell โดยวิธี ELISA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้ปริมาณ GenCarrier-1™ transfection reagent มากขึ้นค่า Absorbance 450 นาโนเมตรผลที่ได้ไม่แตกต่างกันมากโดยค่าที่สูงและชัดเจนที่สุดอยู่ที่ปริมาณ GenCarrier-1™ transfection reagent 2.5 µl ซึ่งเหมาะที่จะนำไปใช้ในการ Transfection แต่ที่ปริมาณ GenCarrier-1™ transfection reagent1 µl ก็ให้ค่าที่น้อยกว่าเพียงเล็กน้อย หากต้องใช้ Transfection ในปริมาณที่มากจึงควรเลือกที่ปริมาณ GenCarrier-1™ transfection reagent1 µl แทน เพื่อเป็นการประหยัด GenCarrier-1™ transfection reagent แต่ผลที่ได้ยังคงสูงและชัดเจนอยู่

จากผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการ transfection แสดงว่าปริมาณ GenCarrier-1™ transfection reagent ที่ 1 µl ต่อปริมาณพลาสมิดลูกผสม 1 µg สามารถเกิดเป็น DNA-lipid complex ที่สมบูรณ์เกิดปฏิสัมพันธ์กับเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีประจุลบได้ ทำให้เซลล์เกิดกระบวนการ endocytosis นำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้

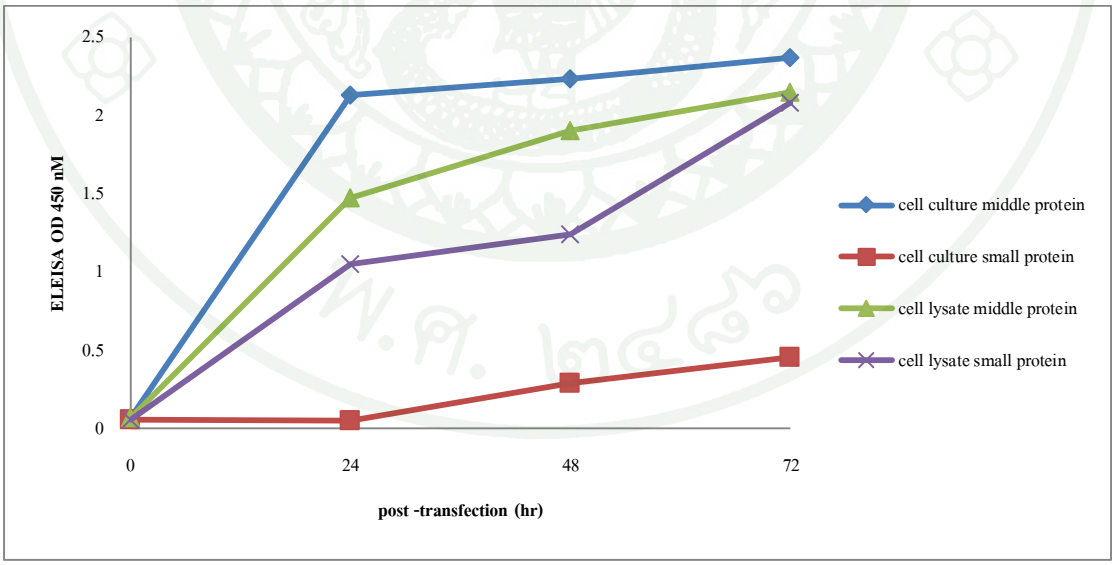
**5. ผลการตรวจสอบการแสดงออกของ HBsAg ด้วยวิธี ELISA**

หลังจากการ transfection เซลล์ด้วยพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *PreS2+S* และยีน *S* เพื่อให้มีการแสดงออกของ middle protein และ small protein ใน mammalian cells และทำการเก็บตัวอย่างที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของ HBsAg ด้วยวิธี ELISA ผลแสดงดังตารางที่ 4 และภาพที่ 16

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

**ตารางที่ 4** ผลการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี ELISA หลังการ transfection ที่ชั่วโมงต่างๆ

| ตัวอย่าง | ระยะเวลาเลี้ยงเซลล์ หลังการ transfection (ชม.) | Middle protein Absorbance 450 nm | Smallprotien Absorbance450 nm |
|---|---|---|---|
| น้ำเลี้ยงเซลล์ | 24 | 2.127 | 0.052 |
| | 48 | 2.333 | 0.290 |
| | 72 | 2.369 | 0.456 |
| cell lysate | 24 | 1.472 | 1.050 |
| | 48 | 1.902 | 1.239 |
| | 72 | 2.146 | 2.080 |
| Blank | | 0.067 | 0.055 |




**ภาพที่ 16** ผลการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี ELISA หลังการ transfection ที่ชั่วโมงต่างๆ

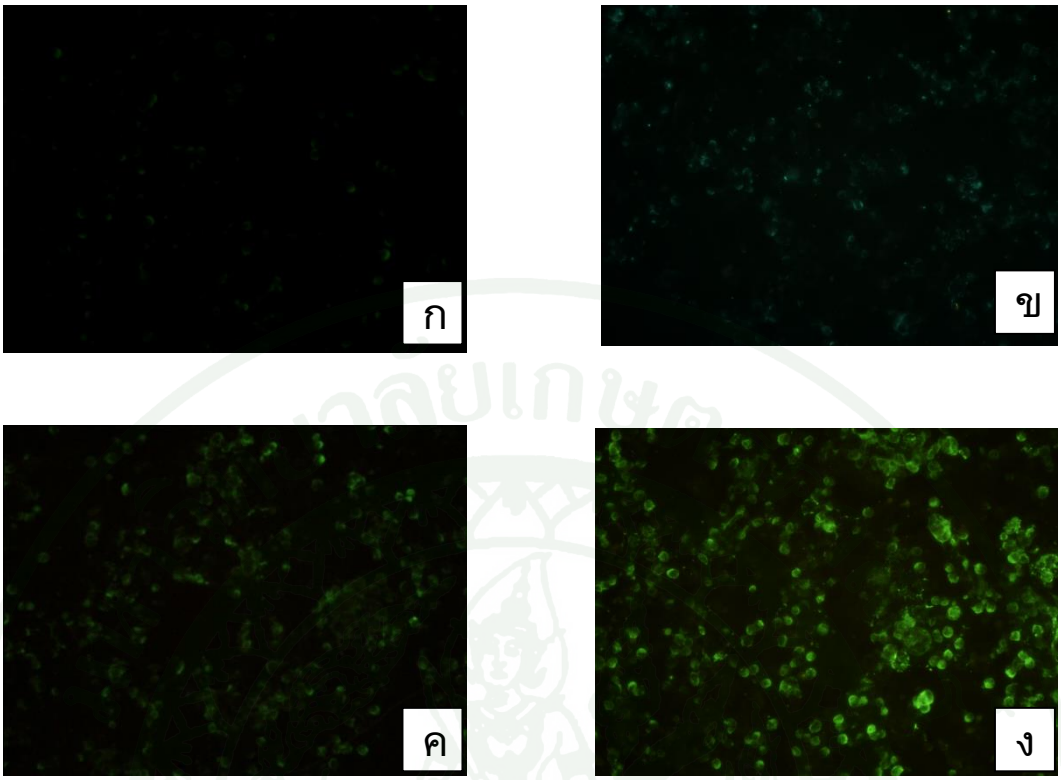
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากผลการทดลองพบว่าสามารถตรวจพบโปรตีนชนิด middle protein ในน้ำเลี้ยงเซลล์หลังการ transfection แล้ว 24 ชั่วโมง ค่าAbsorbance ได้ 2.127 ส่วนโปรตีนชนิด small protein สามารถตรวจพบในน้ำเลี้ยงเซลล์หลังการ transfection แล้ว 48 ชั่วโมง ค่าAbsorbance ได้ 0.290 และพบว่าปริมาณโปรตีนมีการเพิ่มขึ้นเรื่อยๆทั้งในเซลล์และภายนอกเซลล์ตามระยะเวลาเลี้ยงเซลล์ แสดงว่า signal sequence ที่ใช้มีความเหมาะสมในการทำให้เซลล์หลั่งโปรตีนออกมาภายนอกเซลล์ได้

**6. ผลการตรวจสอบการแสดงออกของ middle protein และ small protein ด้วยวิธี IFA**

หลังจากการ transfection เซลล์ด้วยพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *PreS2+S* และยีน *S* เพื่อให้มีการแสดงออกของ middle protein และ small protein ใน mammalian cells และทำการเก็บตัวอย่างที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของ HBsAg ด้วยวิธี IFA โดยใช้ monoclonal antibody โคลน HB3 และ Anti-mouse immunoglobulins : Alexa (Invitrogen) เป็นตัวจับกับ HBsAg แล้วส่องดูการเรืองแสงภายใต้กล้อง Fluorescent microscope ผลดังแสดงในภาพที่ 17 และ 18 ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์




**ภาพที่ 17** ผลการตรวจสอบการแสดงออกของ middle protein ด้วยวิธี IFA หลังการ transfection ที่ชั่วโมงต่างๆ

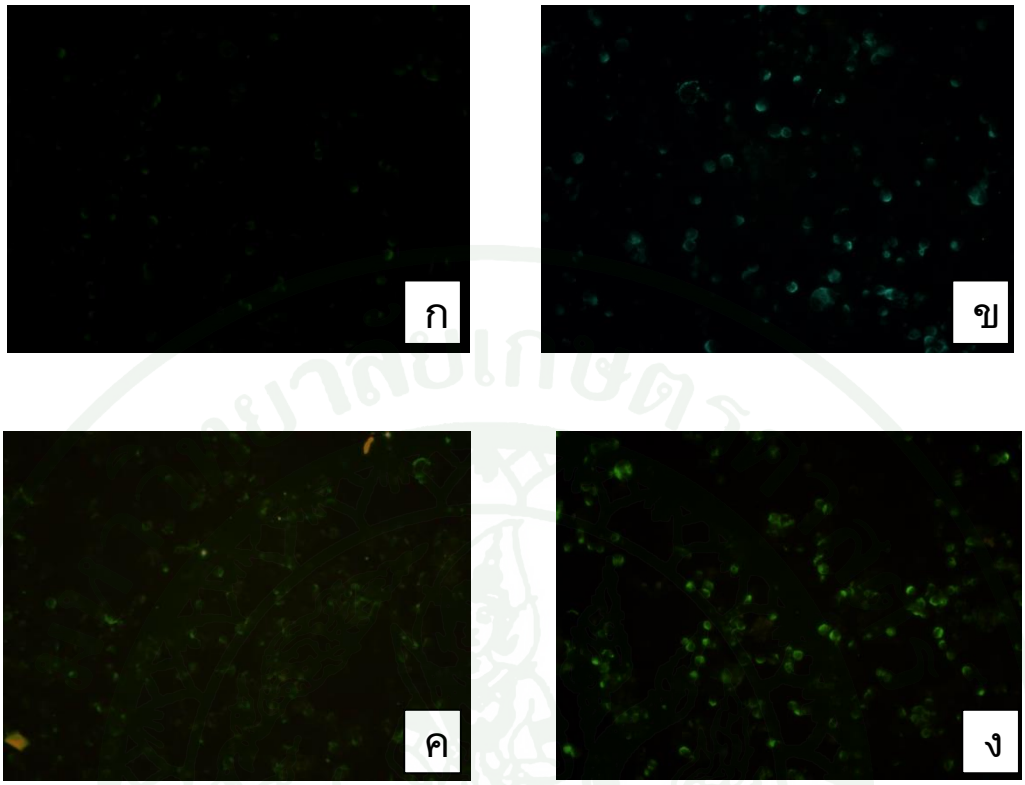
ก. ตัวอย่างเซลล์หลังการ transfectionด้วยพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *PreS2+S* ที่ 0 ชั่วโมง

ข. ตัวอย่างเซลล์หลังการ transfectionด้วยพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *PreS2+S* ที่ 24 ชั่วโมง

ค. ตัวอย่างเซลล์หลังการ transfectionด้วยพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *PreS2+S* ที่ 48 ชั่วโมง

ง. ตัวอย่างเซลล์หลังการ transfectionด้วยพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *PreS2+S* ที่ 72 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์




**ภาพที่ 18** ผลการตรวจสอบการแสดงออกของ small protein ด้วยวิธี IFA หลังการ transfection ที่ชั่วโมงต่างๆ

ก. ตัวอย่างเซลล์หลังการ transfectionด้วยพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *S* ที่ 0 ชั่วโมง

ข. ตัวอย่างเซลล์หลังการ transfectionด้วยพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *S* ที่ 24 ชั่วโมง

ค. ตัวอย่างเซลล์หลังการ transfectionด้วยพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *S* ที่ 48 ชั่วโมง

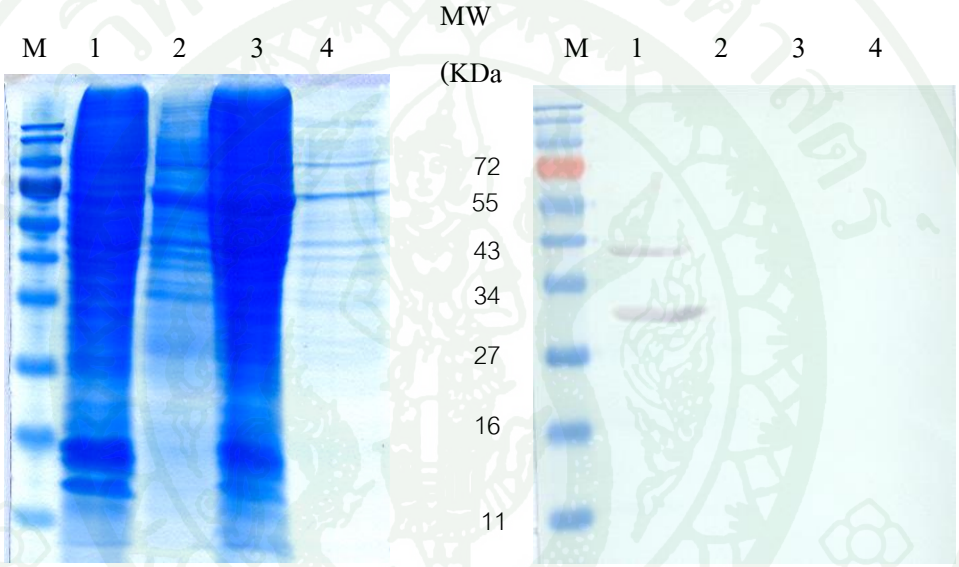
ง. ตัวอย่างเซลล์หลังการ transfectionด้วยพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *S* ที่ 72 ชั่วโมง

จากผลการทดลองพบว่า middle protein และ small protein ที่ผลิตได้จาก mammalian cells นั้นมีความจำเพาะกับ monoclonal antibody โคลน HB3 ที่ใช้ตรวจสอบ สังเกตได้จากการเรืองแสงของเซลล์แสดงว่ามีการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี เริ่มแสดงให้เห็นตั้งแต่ 24 ชั่วโมง และมีการเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆจนถึง 72 ชั่วโมง และพบว่า middle protein มีการเรืองแสงที่ค่อยข้างมากกว่า small protein ซึ่งผล IFA ที่ได้สอดคล้องกับผล ELISA ก่อนหน้านี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

**7. ผลการแยกขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และตรวจสอบความจำเพาะของโปรตีนด้วยวิธี Western blot analysis**

ภายหลังจากการแยกขนาดของโปรตีนของ HBsAg ชนิด middle protein และ small protein ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า ขนาดของโปรตีนมีการแยกเป็นหน่วยย่อยตามน้ำหนักโมเลกุล โดยเห็นแถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 กิโลดาลตัน ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็น HBsAgใน lane ที่ 1และ 2 ดังแสดงผลในภาพที่ 19 (ก)




ก. ข.

**ภาพที่ 19** ก. ผลการแยกขนาดของโปรตีน HBsAg ด้วยวิธี SDS-PAGE

ข. ผลการตรวจสอบความจำเพาะของโปรตีน HBsAg กับ polyclonal antibody ต่อ HBsAgด้วยวิธี Western blot

M = โปรตีนมาตรฐาน

Lane 1 = middle protein จาก cell lysate

Lane 2 = middle protein จาก cell culture

Lane 3 = small protein จาก cell lysate

Lane 4 = small protein จาก cell culture

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลการตรวจสอบความจำเพาะของโปรตีน HBsAg กับ polyclonal antibody ต่อ HBsAg ด้วยวิธี Western blot พบว่า มีการทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแถบโปรตีน2 แถบ ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 กิโลดาลตันและ 40 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็น middle protein โดยตรวจพบในส่วนโปรตีนภายในเซลล์เท่านั้น ไม่พบนอกเซลล์ ดังแสดงผลในภาพที่ 19 (ข) lane ที่ 1 และ 2 ส่วน small protein ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี Western blot ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีการแสดงออกของ small protein ในปริมาณน้อยเกินไป ดังแสดงในภาพที่ 19 (ข) lane ที่ 3 และ 4

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

# วิจารณ์

งานวิจัยนี้นำพลาสมิดที่บรรจุยีน HBsAg มาทำการเพิ่มปริมาณยีน *PreS2+S* และยีน *S* ของไวรัสตับอักเสบบี แล้วนำมาเชื่อมกับเวคเตอร์ pcDNA3.4 ได้พลาสมิดลูกผสม pcDNA3.4/PreS2+S ที่มียีน *PreS2+S* ขนาด 984 คู่เบส และได้พลาสมิดลูกผสม pcDNA3.4/S ที่มียีน *S* ขนาด 819 คู่เบส ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาที่ใช้เวคเตอร์ pcDNA3.1/His A ในการโคลนยีน *PreS2+S* ได้ยีนที่มีขนาด 846 คู่เบส และยีน *S* มีขนาด 681 คู่เบส (กษมาและคณะ, 2556) เพราะในการเพิ่มปริมาณยีนมีการเติมส่วน secretory signal sequence ลงไปเพื่อให้โปรตีนมีการหลั่งออกนอกเซลล์ ทำให้ชิ้นยีนที่ได้มีขนาดที่ใหญ่กว่า เมื่อนำชิ้นยีนที่ได้ไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีน HBsAg 90% โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่งแตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเกิดจากการกลายพันธ์ของยีน HBsAg ในพลาสมิดที่ใช้

เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี ELISA สามารถตรวจพบ middle protein ทั้งในน้ำเลี้ยงเซลล์และภายในเซลล์ ส่วน small protein สามารถตรวจพบในน้ำเลี้ยงเซลล์และภายนอกเซลล์ได้เช่นกันแต่ให้ปริมาณ ที่น้อยกว่า เมื่อตรวจสอบการใช้ codon usage ของ mammalian cell กับ codon ของชิ้นยีนพบว่ามีบาง codon ของชิ้นยีนไม่เหมาะสมกับการแสดงออกในเซลล์ อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้มีการแสดงออกของโปรตีนในปริมาณน้อย หากต้องการเพิ่มประสิทธิภาพในการแสดงออกของ small protein อาจต้องปรับ codon ของยีน (codon optimization) เพื่อสั่งสังเคราะห์ยีนขึ้นมาใหม่ มีรายงานการทำการออกแบบยีนสังเคราะห์ *preS1* โดยการเลือกใช้ codon ที่เหมาะสม ทำให้ได้ปริมาณโปรตีนที่สูงถึง 28 มิลลิกรัมต่อลิตร (QianBingjun*et a*l., 2006)

การตรวจสอบการแสดงออกของ middle protein ด้วยวิธี ELISA พบว่ามีสามารถตรวจพบได้ทั้งใน cell lysate และน้ำเลี้ยงเซลล์ โดยที่เวลา 72 ชั่วโมงวัดค่า Absorbance ในน้ำเลี้ยงเซลล์สูงถึง 2.369 และใน cell lysate วัดค่า Absorbanceได้ 2.127 แสดงว่าเซลล์สามารถหลั่งโปรตีนออกมาภายนอกเซลล์ได้ เมื่อตรวจสอบความจำเพาะของโปรตีนกับ monoclonal antibody โคลน HB3 ด้วยวิธี IFA ก็พบการแสดงออกของโปรตีนตั้งแต่ 24 ชั่วโมงหลังการ transfection สังเกตได้จากการเรือง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แสงของเซลล์แสดงว่ามีการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี และพบมากที่สุดที่ 72 ชั่วโมง เมื่อนำไปแยกขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และตรวจสอบความจำเพาะด้วยวิธี Western blot พบให้ผลบวกจาก cell lysate โดยมีขนาดประมาณ 30 กิโลดาลตัน และ 40 กิโลดาลตัน เพราะ middle protein ถูกสร้างมาจาก *S* ORF ส่วน *S* และ *PreS2* ซึ่งตามปกติแล้วโปรตีนของ HBsAg ประกอบด้วยหน่วยย่อยดังนี้ P25, GP27, GP33, GP36, GP39 และ GP42 (Teresa *et.al*.,2014) แต่ขนาดของแถบโปรตีนมีขนาดที่ค่อนข้างใหญ่เพราะเป็นโปรตีนที่พบภายในเซลล์ไม่มีกระบวนการ glycosylation และตัดส่วน secretary singnalseqeunceออก ทำให้โปรตีนที่พบมีขนาดที่ค่อนข้างใหญ่

การตรวจสอบการแสดงออกของ small protein ด้วยวิธี ELISA พบว่ามีสามารถตรวจพบได้ทั้งใน cell lysate และน้ำเลี้ยงเซลล์ โดยที่เวลา 72 ชั่วโมงวัดค่า Absorbance ในน้ำเลี้ยงเซลล์ได้ 0.456 และใน cell lysate วัดค่า Absorbanceได้ 2.080 ต้องทำให้เซลล์แตกเพื่อให้ได้โปรตีนที่ต้องการออกมา เนื่องจากการแสดงออกของโปรตีนมีปริมาณน้อยจึงอาจทำให้โปรตีนอยู่ภายในเซลล์ไม่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณพลาสมิดลูกผสมที่นำเข้าสู่เซลล์อาจน้อยเกินไป เมื่อตรวจสอบความจำเพาะของโปรตีนกับ monoclonal antibody โคลน HB3 ด้วยวิธี IFA ก็พบการแสดงออกของโปรตีนตั้งแต่ 48 ชั่วโมงหลังการ transfection สังเกตได้จากการเรืองแสงของเซลล์แสดงว่ามีการจับกันระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี

ดังนั้นมีความเป็นไปได้ที่จะนำโปรตีนของไวรัสตับอักเสบบีที่ผลิตได้นี้ไปใช้ในการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยทางภูมิคุ้มกันหรือพัฒนาวัคซีนป้องกันไวรัสตับอักเสบบีต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

# สรุปผลการทดลอง

จากการเพิ่มปริมาณยีน *PreS2+S* และ ยีน *S* จากตัวอย่างพลาสมิดพบว่า ได้ยีน *Pres2+S* ที่มีขนาดประมาณ 984 คู่เบส และยีน *S* มีขนาดประมาณ 819 คู่เบส หลังจากนั้นนำมาสร้างพลาสมิดลูกผสมโดยใช้เวคเตอร์ pcDNA3.4 ผลการทดลองได้พลาสมิดลูกผสม pcDNA3.4/*PreS2+S* จำนวน 1 โคลน และพลาสมิดลูกผสม pcDNA3.4/*S* จำนวน 5 โคลน เมื่อนำไปตรวจสอบหาความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า pcDNA3.4/*PreS2+S*โคลน 4 และ pcDNA3.4/*S*โคลน 2 มีการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ในทิศทางที่ถูกต้อง

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการ Transfection พบว่า ปริมาณ transfection reagent 1 µl ต่อปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอ 1 µg คิดเป็นอัตราส่วน 1:1 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณการ transfetion มากที่สุด

จากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน middle protein และ small protein ด้วยวิธี ELISA พบว่า middle protein สามารถตรวจพบโปรตีนในน้ำเลี้ยงเซลล์หลังการ transfection แล้ว 24 ชั่วโมง ส่วน Small protein สามารถตรวจพบโปรตีนในน้ำเลี้ยงเซลล์หลังการ transfection แล้ว 48 ชั่วโมง และมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆตามลำดับจนถึง 72 ชั่วโมงหลังการ transfectionเมื่อนำไปตรวจสอบความจำเพาะของ HBsAg ที่ผลิตได้ด้วยวิธี IFA พบว่า HBsAg มีความจำเพาะต่อ monoclonal antibody โคลน HB3 ที่ใช้ทดสอบ ทั้ง middle protein และ small protein โดยมีการแสดงออกชัดเจนที่ 72 ชั่วโมงหลังการ transfection

ผลการแยกขนาดของโปรตีนสามารถตรวจพบ middle protein ขนาดของโปรตีนมีการแยกเป็นหน่วยย่อยตามน้ำหนักโมเลกุลผลการตรวจสอบความจำเพาะของโปรตีน HBsAg กับ polyclonal antibody ต่อ HBsAg ด้วยวิธี Western blot พบว่า middle protein มีการทำปฏิกิริยาจำเพาะกับแถบโปรตีน 2 แถบ ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 กิโลดาลตันและ 40 กิโลดาลตัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

# เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กัญญจนา นึกดี. 2550. **เอกสารประกอบการสอนไวรัสวิทยา.** มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, อุบลราชธานี.

ชโลบล อยู่สุข. 2540. ไวรัสก่อโรคตับอักเสบ, น. 56-78 *ในพิไลพันธุ์ พุธวัฒนะ.* **ไวรัสวิทยา.** อักษรสมัย, กรุงเทพฯ.

ดวงรัตน์ จุลอักษร. 2546. **การผลิตและศึกษาคุณสมบัติโมโนโคลนอลแอนติบอดี ต่อ commaon antigenic determinant ของวรัสตับอักเสบบี.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสร์.

นภารัตน์ แก้วเกื้อกูล. 2553. **การตวจหา anti-GBM antibody ด้วยเทคนิคอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์.** มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

ปาริชาติ พุ่มขจร. 2551. **เอกสารประกอบการสอนวิทยาภูมิคุ้มกัน.** มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, อุบลราชธานี.

ศิริกฤษ์ ทรงวิไล. 2543. **ตับอักเสบจากไวรัส.** บางกอกบล็อก, กรุงเทพฯ.

Andersson, S., D. L Davis.,H.Dahlbäck., H. Jörnvall., and D. W. Russell. 1989. Cloning, Structure, and Expression of the Mitochondrial Cytochrome P-450 Sterol 26-Hydroxylase, a Bile Acid Biosynthetic Enzyme**. J. Biol. Chem.**264: 8222-8229

Arnold, J. L. 1992. **Viruses.** Scientific American library, New york. 181.

Berson, S. and RS.Yellow .1959. Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. **J Clin Invest38**, 1996–2016.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Cole, C. N. and T. P. Stacy. 1985. Identification of Sequences in the Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase Gene Required for Efficient Processing and Polyadenylation. **Mol. Cell. Biol.***5*, 2104-2113.

Goding, W. J. 1996. **Monoclonal Antibodies Principles and Practice Production and Application of McAb in cell biology, Chemistry and Immunology.** 3rd ed, Academic Press., Inc., San Diego, CA.

Guo, M., B. Kang.and Q. Zheng. 2009. An anti-preS2 antibody protects human hepatocytes from hepatitis B virus infection. **ActaGastroenterol Belg**. 72: 306-11.

Jun-Yuan, G., Y. Dong., T. Zhou.and J. Wuli. 2013. Construction and expression of a recombinant eukaryotic expression plasmid containing the preS1-preS2-S genes of hepatitis B virus and the granulocyte-macrophage colony stimulating factor gene : A study ot its immunomodulatory effects. **Biomedical reports.** 1: 251-256.

Luksamijarulkul, P., N. Thammata.and M. Tiloklurs. 2002. Seroprevalence of hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency virus among blood donors, Phitsanulok Regional Blood Center, Thailand. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**. 33: 272-9.

Michael, M. L. 2008. Synthesis in Animal Cell Hepatitis B Surface Antigen Particle Carrying a Receptor for Polymerixed Human Serum Albumin. **Proceeding of the National Academy of Science.** 81: 7708-7712.

Micheline, F. and O. Gerard. 1989. Immunofluorescence Assay for Human Immunodeficiency Virus Antibody: Investigation of Cell Fixation for Virus Inactivation and Antigen Preservation. **J. Clinical. Microbiology.** 27(8): 1810-1813.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Monkongdee, P., C. Boonchird. and K. Balachandra. 1998. Cloning and sequence analysis of hepatitis B virus genome of adr subtype isolated in Thailand. **J SciSoc Thailand**. 24: 155-67.

Naaz, A., A. Ahmad. and A. R. Shakoori. 2007. Overexpression and Purification of PreS Region of Hepatitis B virus Antiginic Surface Protein adr Subtype in *Escherichia coli*. **J Biochemistry and Molecular Biology.** 40: 1002-1008.

Park, J.H., M.K. Lee, H.S. Kim. and E.W. Cho. 2003. Targeted destruction of the polymerized human serum albumin binding site within the preS2 region of the HBV surface antigen while retaining full immunogenicity for this epitope. **J Viral Hepat**.10: 70-9.

Punyagupta, S., L. C. Olson, U. Harinasuta, K. Akarawong and W. Varawidhya. 1973. The epidemiology of hepatitis B antigen in a high prevalence area. **Am J Epidemiol**. 97: 349-54.

Rich, J.D. 2003. A review of the case for hepatitis B vaccination of high-risk adults.**American Journal of Medicine.** 114:316–318.

Robinson, M.S. 1985. Collusion and the choice of auction.**RAND Journal of Economics**.16: 141 – 145.

Seeger, C. and W.S. Mason. 2000. **Microbiology and Molecular Biology Review**. 4(1): 51-68.

Sells, M.A., M.L.Chen.and G. Acs. 1987. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. **Proc Natl Acad Sci USA**. 84: 1005-9.

Shuping, P., K. H. Kim, C. Chante, J. Wands and J. Li. 2005.Hepatitis B Virus e Antigen Variants. **Int. J. Med. Sci**. 2(1): 2-7.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Stimson, W. and J.M. Sinclair. 1974. An immunoassay for a pregnancy associated amacroglobulin using antibody enzyme conjugates. **FEBS Letters** 47: 190-192.

Teresa, P., I. Cacciola., F. Saffioti. and G. Raimondo. 2014. Hepatitis B virus PreS/S gene variants: Pathobiology and clinical implications. **J. Hepatology**. 61: 408-417.

Xu, W. Z., Y. Fang. and D. Li. 2008. Construction and expression of eukaryotic plasmids containing lamivudine-resistant or wild-type strains of hepatitis B virus genotype C. **World J Gastroenterol.**14: 3733-8.

Zhang, Q. and C. Guangwen. 2011. Genotypes, mutations, and viral load of hepatitis B virus and the risk of hepatocellular carcinoma. **Hepat Mon.** 11(2):86-91

Zufferey, R., T. Dull., R. J. Mandel., A. Bukovsky., D. Quiroz.,L. Naldini., and D. Trono. 1998. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient *in vivo* gene delivery**. J. Virol.** 72. 9873-9880.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

# ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

# ภาคผนวก

## การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

**1. 2XYT medium**

| | | |
|---|---|---|
| Bacto-tryptone | 17 | กรัม |
| Bacto yeast extract | 10 | กรัม |
| NaCl | 5 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 900 | มิลลิตร |

ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

**2. 2XYT agar**

| | | |
|---|---|---|
| Bacto-tryptone | 1.7 | กรัม |
| Bacto yeast extract | 1.0 | กรัม |
| Bacto agar | 1.5 | กรัม |
| NaCl | 0.5 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 80 | มิลลิลิตร |

ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

**3. SOB medium (Super Optimal Broth medium)**

| | | |
|---|---|---|
| Bacto-tryptone | 10 | กรัม |
| Bacto yeast extract | 2.5 | กรัม |
| NaCl | 0.25 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 200 | มิลลิลิตร |

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

**4. 20 mg/ml Ampicillin**

| | | |
|---|---|---|
| Ampicillin | 100 | มิลลิกรัม |
| เติมน้ำกลั่นให้ครบ | 5 | มิลลิลิตร |

ผสมให้เข้ากันแล้วกรองด้วยตัวกรอง 0.2 ไมโครเมตรเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

**5. 20% Glucose**

| | | |
|---|---|---|
| Glucose | 20 | กรัม |
| เติมน้ำกลั่นให้ครบ | 100 | มิลลิลิตร |

ผสมให้เข้ากันแล้วกรองด้วยตัวกรอง 0.2 ไมโครเมตรเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

## การเตรียมบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆที่ใช้ใน ELISA

**1. phosphate buffer saline (PBS)**

| | | |
|---|---|---|
| $KH_2PO_4$ | 0.2 | กรัม |
| $Na_2HPO_4.12H_2O$ | 2.9 | กรัม |
| KCl | 0.2 | กรัม |
| NaCl | 8 | กรัม |

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

**2. Coating buffer (carbonate - bicarbonate buffer pH 9.6)**

| | | |
|---|---|---|
| $Na_2CO$ | 1.59 | กรัม |
| $Na_2HPO_4.12H_2O$ | 2.39 | กรัม |

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

| | | |
|---|---|---|
| ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมตารครบ | 1,000 | มิลลิลิตร |

**3. PBS - T (PBS pH 7.4 + tween20 ความเข้มข้น 0.05%)**

| | | |
|---|---|---|
| $KH_2PO_4$ | 0.2 | กรัม |
| $Na_2HPO_4.12H_2O$ | 2.9 | กรัม |
| KCl | 0.2 | กรัม |
| NaCl | 8 | กรัม |

ละลายน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1 ลิตรแล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เมื่อจะนำไปใช้เติม tween20 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

**4. Blocking solution**

| | | |
|---|---|---|
| Skim milk power (Gibco) | 8 | กรัม |
| PBS | 100 | มิลลิลิตร |

**5. สารละลายกรดไฮโดรคลอลิค (1% HCl)**

| | | |
|---|---|---|
| HCl | 1 | มิลลิลิตร |
| เติมน้ำกลั่น | 99 | มิลลิลิตร |

**6. CCMB80 buffer**

| | | |
|---|---|---|
| 10 mMKOAc pH7.0 | 2 | มิลลิลิตร |
| 80 mM $CaCl_2.2H_2O$ | 2.36 | กรัม |
| 20 mM $MnCl_2.4H_2O$ | 0.8 | กรัม |
| 10 mM $MgCl_2.6H_2O$ | 0.4 | กรัม |
| 10% glycerol | 20 | มิลลิลิตร |

ปรับ pH เป็น 6.4 ด้วย HClจากนั้นปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิตรแก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

**การเตรียม 1.2%agarose gel**

| | | |
|---|---|---|
| Agarose | 1.2 | กรัม |
| เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร | 100 | มิลลิลิตร |

นำไปต้มให้เจลละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเทลงใน Tray พร้อมทั้งใส่ combตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว

**การเตรียม 50X TAE buffer**

| | | |
|---|---|---|
| Tris Base | 242 | กรัม |
| Glacial Acetic Acid | 57.1 | มิลลิลิตร |
| 0.5 M EDTA pH 8.0 | 100 | มิลลิลิตร |

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

**การเตรียมบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆที่ใช้ใน IFA**

1. **phosphate buffer saline (PBS)**

| | | |
|---|---|---|
| $KH_2PO_4$ | 0.2 | กรัม |
| $Na_2HPO_4.12H_2O$ | 2.9 | กรัม |
| KCl | 0.2 | กรัม |
| NaCl | 8 | กรัม |

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลลเซียสเป็นเวลา 15 นาที กรองด้วยตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

**2. 40% methanol in acetone**

| | | |
|---|---|---|
| methanol | 40 | มิลลิลิตร |
| acetone | 60 | มิลลิลิตร |

ผสมให้เข้ากันเก็บแช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส

**<u>การเตรียมสารสำหรับแยกโปรตีนโดยวิธี</u>** <u>SDS-PAGE</u>

**1. Acrylamide stock**

30%Acrylamide/Bis solution (37.5:1) Bio-Rad

**2. บัฟเฟอร์ A (0.5 M Tris-hydrochloric pH 6.8)**

| | | |
|---|---|---|
| Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Sigma) | 6.05 | กรัม |
| ละลายในน้ำกลั่นประมาณ | 50 | มิลลิลิตร |

ปรับให้ได้ pH 6.8 ด้วยสารละลาย 2M HClหลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

**3. บัฟเฟอร์ B (1.5 M Tris-hydrochloric pH 8.8)**

| | | |
|---|---|---|
| Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Sigma) | 18.15 | กรัม |
| ละลายในน้ำกลั่นประมาณ | 50 | มิลลิลิตร |

ปรับให้ได้ pH 8.8 ด้วยสารละลาย 2 M HClหลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

**4. APS (ammonium persulphateความเข้มข้น 10%)**

| | | |
|---|---|---|
| Ammonium persulphate (Sigma) | 0.01 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 0.1 | มิลลิลิตร |

เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

**5. SDS (sodium dodecyl sulfate ความเข้มข้น 10%)**

| | | |
|---|---|---|
| sodium dodecyl sulfate (Sigma) | 1 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 10 | มิลลิลิตร |

**6. TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl ethylene diamine)**

ใช้ TEMED (Sigma) โดยตรงไม่ต้องทำให้เจือจางก่อน

**7. Acrylamide separating gel ความเข้มข้น 12%**

| | | |
|---|---|---|
| น้ำกลั่น | 3.25 | มิลลิลิตร |
| บัฟเฟอร์ B | 2.5 | มิลลิลิตร |
| SDS | 100 | มิลลิลิตร |
| Acrylamide stock | 4 | มิลลิลิตร |
| APS | 50 | ไมโครลิตร |
| TEMED | 5 | ไมโครลิตร |

**8. acrylamide stacking gel ความเข้มข้น 4%**

| | | |
|---|---|---|
| น้ำกลั่น | 3 | มิลลิลิตร |
| บัฟเฟอร์ A | 1.25 | มิลลิลิตร |
| SDS | 50 | ไมโครลิตร |
| APS | 25 | ไมโครลิตร |
| TEMED | 5 | ไมโครลิตร |

**9. 5x Sample buffer**

| | | |
|---|---|---|
| Tris | 0.375 | กรัม |
| 2-mercaptoethanol | 2.5 | มิลลิลิตร |
| Glycerol | 5 | มิลลิลิตร |

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

| | | |
|---|---|---|
| SDS | 1 | กรัม |
| Bromphenol blue (R) | 0.053 | กรัม |
| เติมน้ำกลั่นให้ครบ | 2.5 | มิลลิลิตร |

ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดแช่แข็งหลอดละ 1 ml เก็บที่อุณหภูมิ -20องศาเซลเซียส

**10. Electrophoresis buffer**

| | | |
|---|---|---|
| TrisZhydroxymethyl) aminomethane | 3.03 | กรัม |
| Glycine | 14.40 | กรัม |
| Sodium dodecylsulfate | 1.00 | กรัม |
| เติมน้ำกลั่นให้ครบ | 1,000 | มิลลิลิตร |

**การเตรียมสารสำหรับ** western blot analysis

**1. Transfer buffer (25 nm Tris ,192 nm glycine ,20%v/v methanol pH 8.3)**

| | | |
|---|---|---|
| Tris (hydroxymethy) aminomethane | 3.03 | กรัม |
| Glycine | 14.04 | กรัม |
| Methanol | 200 | มิลลิลิตร |
| เติมน้ำกลั่นให้ครบ | 1,000 | มิลลิลิตร |

**2. Tris buffer pH 7.5 (0.1 M Tris-hydrochloric pH7.5)**

| | | |
|---|---|---|
| Tris (hydroxymethyl) aminomethane | 12.1 | กรัม |
| ละลายในน้ำกลั่นประมาณ | 900 | มิลลิลิตร |

ปรับให้ได้ pH 7.5 ด้วยสารละลาย 2 M HClหลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นครบ 1,000 มิลลิลิตร

**3. TBS (Tris-buffered saline)**

| | | |
|---|---|---|
| Nacl | 9 | กรัม |
| Tris buffer pH 7.5 เติมครบ | 1,000 | มิลลิลิตร |

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

**4. TTBS (tris-buffered saline + tween 20 ความเข้มข้น 0.1 %)**

| | | |
|---|---|---|
| TBS | 1,000 | มิลลิลิตร |
| Tween 20 | 1 | มิลลิลิตร |

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

# ประวัติการศึกษาและการทำงาน

| | |
|---|---|
| ชื่อ | นางสาวภัทรกนัย์ มีศิริ |
| เกิดวันที่ | 16 มีนาคม2530 |
| สถานที่เกิด | อำเภอเมือง จังหวัดอำนาจเจริญ |
| ประวัติการศึกษา | มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนเตรียมอุดมศึกษาภาตะวันออกเฉียงเหนือ |
| | วท.บ. (วิทยาศาสตร์) หมาวิทยาลัยอุบลราชธานี |
| ตำแหน่งปัจจุบัน | นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ |
| สถานที่ทำงานปัจจุบัน | สถาบันวิจัยสมุนไพร กระทรวงสาธารณสุข |

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์