หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนของไวรัสไข้เลือดออกซีโรทัยป์ 3 ในระบบของ *E. coli* และการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ immobilized metal affinity chromatography
นักศึกษา	นางสาว สุภา ศรีสะอาด
รหัสประจำตัว	39065200
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2542
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ดร. ชัญญา พุทธิขันธ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผศ. อรไท สุขเจริญ

บทคัดย่อ

โรคไข้เลือดออก เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสเด็งกี่โดยมียุงลาย (*Aedes aegypti* และ *Aedes albopictus*) เป็นพาหะนำโรค ไวรัสเด็งกี่มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอนเอสายเดี่ยว ล้อมรอบด้วยนิวคลีโอแคปสิด ประกอบด้วยยีนที่สังเคราะห์โปรตีนโครงสร้างและโปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้าง โดยมีลำดับการเรียงตัวของยีนดังนี้

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

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนส่วนเปลือกหุ้มของเชื้อไวรัสเด็งกี่ระบบของเซลล์ *Escherichia coli* (*E.coli*) โดยการสกัดอาร์เอนเอของไวรัสเด็งกี่ซีโรทัยป์ 3 สายพันธุ์ H87 จากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยง C6/36 ที่มีการติดเชื้อไวรัสและเพิ่มจำนวนยีนส่วนเปลือกหุ้มจากอาร์เอ็นเอโดยวิธี รีเวอร์สทรานสคริบชั่นและโพลีเมอเรสเชนรีแอคชั่น (RT-PCR) พบว่าได้ชิ้นอาร์ที-พีซีอาร์โปรดักส์ ขนาด 1,264 นิวคลีโอไทด์ที่ประกอบด้วยส่วนของยีนส่วนเปลือกหุ้ม (den3E) และลำดับเบสของเรสติกชั่นเอนไซม์ที่ปลาย 5' และ 3' เพื่อใช้ในการทำโคลนนิ่ง ยีน den3E ประกอบด้วย 1,227 นิวคลีโอไทด์จากยีนส่วนเปลือกหุ้มทั้งหมด 1,479 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งครอบคลุมกรดอะมิโน 409 ตัว แต่ไม่รวมกรดอะมิโนที่ไม่ละลายน้ำ 84 ตัว จากปลายคาร์บอกซี นำพีซีอาร์โปรดักส์มาตัดด้วยเรสติกชั่นเอนไซม์คือ *Bam*HI และ *Eco*RI และทำการโคลนนิ่งเข้าในเวคเตอร์ pTrcHisA ซึ่งเป็นเวคเตอร์สำหรับการแสดงออกของโปรตีนส่วนเปลือกหุ้มในระบบ *Escherichia coli* โคลนที่มีรีคอมบิแนนต์พลาสมิด (pTrcHisA/den3E) สามารถผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนส่วนเปลือกหุ้มที่มีกรดอะมิโนฮีสติดีน 6 ตัวเป็นเปปไทด์พาหะ (6H-D3E) เมื่อมีการเหนี่ยวนำด้วยสารละลาย IPTG 1 มิลลิโมลาร์ โดยโปรตีน 6H-D3E ที่ได้มีขนาดประมาณ 55 กิโลดาลตันอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ สามารถละลายได้ในบัฟเฟอร์ที่มีส่วนประกอบของสารดีเนเจอร์แรนท์ที่รุนแรงคือ สารละลายกัวนิดีน 6 โมลาร์ และถูกแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้ Immobilized metal affinity chromatography (IMAC) ในสภาวะที่

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