

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย เรื่อง

**การผลิต Recombinant influenza HA protein จาก
Baculovirus Expression System สำหรับใช้เป็นวัคซีนไข้หวัด**

**Production of Recombinant Influenza HA protein by
Baculovirus Expression System for use as an influenza vaccine**

เสนอ
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ	ผศ.ดร.กนกวรรณ พุ่มพุดรา
ผู้ร่วมโครงการ	ดร.เพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง ดร.แสงชัย เอกประทุมชัย นายไวรุจน์ เดชมหิตกุล

หน่วยงาน

คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน)
83 หมู่ 8 ท่าข้าม บางขุนเทียน กรุงเทพมหานคร 10150
โทรศัพท์ 0 2470-7500 โทรสาร 0 2452-345

บทคัดย่อ

การระบาดของไวรัส Influenza (H5N1) ในสัตว์ปีก และรายงานการติดเชื้อสายพันธุ์นี้จากสัตว์ปีกไปสู่คนในช่วงระหว่างปี ค.ศ. 2004-2005 ก่อให้เกิดความกังวลไปทั่วโลกว่าไวรัสสายพันธุ์นี้อาจเกิดกลายพันธุ์และสามารถแพร่เชื้อระหว่างมนุษย์ อาจทำให้เกิดเกิดการระบาดไปทั่วโลก (pandemic) การใช้วัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อกรณีมีการระบาดเกิดขึ้น เป็นวิธีการหลักซึ่งจะช่วยลดความสูญเสียต่อชีวิตและทรัพย์สินของประชากรโลกได้ การผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัสในปัจจุบันเป็นการผลิตไวรัส ซึ่งต้องมีการป้องกันการแพร่ของเชื้อไปยังสิ่งแวดล้อมขณะดำเนินการผลิต ซึ่งระบบป้องกันนั้นมีต้นทุนสูง โดยเฉพาะในการขยายขนาดการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

การผลิตวัคซีนในรูปแบบการใช้เฉพาะโปรตีนองค์ประกอบของไวรัสส่วนที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี เช่น Hemagglutinin เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการผลิตวัคซีนที่ไม่ต้องมีระบบควบคุมความปลอดภัยของไวรัสขณะดำเนินการผลิต โครงการนี้ได้ทำการผลิต Recombinant hemagglutinin protein จาก Baculovirus Expression Insect Cell System ซึ่งทำโดยการทำพันธุวิศวกรรมแบคทีเรียไวรัส ซึ่งเป็นไวรัสที่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ให้มียีน hemagglutinin ของไวรัสอินฟลูเอนซา (H5N1) ให้แทรกเป็นส่วนหนึ่งของพันธุกรรมและเมื่อนำแบคทีเรียไวรัสนี้ไปติดเชื้อเข้าสู่เซลล์แมลง เซลล์แมลงมีการสร้าง recombinant hemagglutinin protein ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยวิธี Western blot analysis โดยใช้ monoclonal antibody ที่มีความจำเพาะกับโปรตีน hemagglutinin ของไวรัส Influenza (H5N1) โดยโปรตีนที่ผลิตมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับโปรตีน hemagglutinin ของไวรัสอินฟลูเอนซา คือ สามารถตกตะกอนเม็ดเลือดแดง (hemagglutination) เมื่อตรวจสอบด้วย Hemagglutination Assay (HA assay) นอกจากนี้ยังได้ทำการสกัดโปรตีน Recombinant hemagglutinin protein ให้บริสุทธิ์โดยใช้ Chromatography 3 ขั้นตอน ได้แก่ Anion exchange chromatography (QXL/QFF) ต่อด้วย Cation Exchange chromatography (SPFF) และ Hydroxyapatite Chromatography (CHT) เพื่อให้พร้อมนำไปทดสอบการเป็นวัคซีนต่อไป

คำสำคัญ: ไวรัสอินฟลูเอนซา(H5N1)/ Baculovirus expression system/ Hemagglutinin protein

Abstract

Spreading of avian influenza virus (H5N1) and reports on human infection during 2004-2005 caused worldwide concern on influenza pandemic. Vaccine is a main method to prevent losses from this disease. To produce this vaccine, viruses must be produced in large amount to be used as antigen to trigger immune system. The viruses are however infectious, therefore virus containment at high biosafety level is required. This certainly affects cost for construction of vaccine factory.

An alternative method is to use recombinant influenza virus protein as antigen. Viral proteins that stimulate immune response such as hemagglutinin could be used. In this study, hemagglutinin protein was produced by Baculovirus Expression Insect Cell System. Baculovirus, which is safe to human and environment, was genetically engineered to have hemagglutinin gene inserted into its genome. The genetically engineered baculoviruses were then infected into their natural insect cell hosts. The recombinant hemagglutinin protein was produced in infected insect cells as shown by Western blot analysis using a specific monoclonal antibody against HA protein of influenza virus (H5N1). The recombinant hemagglutinin protein was found to be active in Hemagglutination Assay (HA) as its native hemagglutinin protein from influenza virus. Furthermore, the recombinant hemagglutinin protein from infected insect cells can be purified by using 3 steps chromatography; Anion exchange chromatography (QXL/QFF), Cation Exchange chromatography (SPFF) and Hydroxyapatite Chromatography (CHT). The purified recombinant hemagglutinin is now ready to be further tested for vaccine.

Keywords: Influenza virus (H5N1)/ Baculovirus expression system/ Hemagglutinin protein

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	2
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	3
สารบัญ	4
สารบัญตาราง	6
สารบัญภาพ	6
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	7
 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของการวิจัย	8
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	8
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	8
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	9
1.5 หน่วยงานที่จะนำผลประโยชน์	9
1.6 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง	9
ไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Influenza virus)	9
การผลิตโปรตีนโดยใช้ Baculovirus Expression System	13
การผลิตวัคซีน influenza โดย Baculovirus Expresssion Insect Cell System	13
การผลิต Recombinant HA protein โดยใช้ Baculovirus Expression System	15
ก. การทำ Genetic-engineered baculovirus	15
ข. การผลิต Recombinant HA protein ในเซลล์แมลง	17
 บทที่ 2 ระเบียบวิธีการวิจัย	
2.1 การเลี้ยงเซลล์แมลง	18
2.2 การเตรียมแบคทีเรียไวรัส	18
2.3 plaque assay	18
2.4 การเพิ่มจำนวนไวรัสหลังจากการแยกไวรัสให้บริสุทธิ์	19
2.5 การโคลนยีน HA เข้าสู่ Baculovirus Transfer Vector (pFastBacHT b)	19
2.6 การ transformation นำ plasmid (pFASTBacHTb-HA) เข้าสู่ competent <i>E. coli</i> cells	20
2.7 การสกัด genomic baculovirus DNA (Bacmid)	20
2.8 การตรวจสอบ recombinant bacmid โดยใช้เทคนิค PCR	21
2.9 การนำ Recombinant bacmid DNA เข้าสู่เซลล์แมลงโดยวิธี Transfection	21
2.10 การตรวจสอบการสร้าง recombinant hemagglutinin (HA) protein	22
 บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	
3.1 Hemagglutinin Gene (HA gene)	23

3.2 การโคลนยีน HA เข้าสู่ Baculovirus Transfer Vector (pFastBacHTb)	23
3.3 Recombinant pFASTBacHTb	24
3.4 การทำพันธุ์วิศวกรรมแบคทีเรียไวรัส (Recombinant baculovirus)	25
3.5 การตรวจสอบ Recombinant HA bacmid และ Recombinant HA baculovirus	26
3.6 การผลิต Recombinant HA protein	28
3.7 การสกัด recombinant HA protein	29
การเตรียมตัวอย่างโปรตีน	29
การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์	29
1.การกำจัด DNA ปนเปื้อนด้วย Anion Exchange Chromatography	29
2.การสกัดแยก Recombinant HA protein ด้วย Cation Exchange Chromatography	29
3.การสกัด Recombinant HA protein ให้บริสุทธิ์ด้วย Hydroxyapatite CHT™	31
บทที่ 4 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	
4.1 สรุปผลการทดลอง	34
4.2 ข้อเสนอแนะ	34
เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย	35

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1.1	ส่วนประกอบของโปรตีนของไวรัสไข้หวัดใหญ่	11
2.1	ส่วนผสมใน Reaction สำหรับ PCR	19
2.2	สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR	20

สารบัญภาพ

รูป		หน้า
1.1	โครงสร้างของ influenza virus	10
1.2	การเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์เจ้าบ้าน	12
1.3	การใช้ <i>E. coli</i> -based baculovirus shuttle vector	16
1.4	ขั้นตอนการผลิต recombinant protein โดยใช้ Bac-to-Bac	17
3.1	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HA ใน pGEM-T Easy cloning vector	23
3.2	แสดงผลการทำ PCR ของยีน HA โดยใช้ pGEM-T-HA ที่มีส่วนของยีน HA เป็นต้นแบบ	24
3.3	แผนที่พลาสมิด pFastBacHT b	24
3.4	Recombinant pFastBacHT b ที่มียีน HA เชื่อมเข้าเป็นส่วนหนึ่ง	25
3.5	แสดงการตรวจสอบการแทรกของยีน HA เป็นส่วนหนึ่งของ Bacmid	27
3.6	การตรวจสอบยีน HA ซึ่งแทรกอยู่ในจีโนมของ recombinant HA baculovirus	28
3.7	Western Blot Analysis เพื่อตรวจสอบการสังเคราะห์ recombinant HA protein จากเซลล์แมลง	29
3.8	รูปแบบโปรตีนหลังผ่านลงในคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุลบ QFF	30
3.9	ผลการผ่าน QXL/QFF flowthrough ลงในคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุบวก SPFF	30
3.10	รูปแบบโปรตีนหลังการผ่าน SPFF Elute 18-25%B ลงในคอลัมน์ hydroxyapatite (CHT)	31
3.11	การตรวจสอบ Recombinant HA protein ในขั้นตอนการสกัดแยกโปรตีนในขั้นตอนต่างๆ	32

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

°C	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์
MOI	=	Multiplicity of infection
μl	=	Microliter
ml	=	Millilitre
kDa	=	Kilo Dalton
mM	=	Millimolar
ng	=	Nanogram

บทนำ

1.2 ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

การระบาดของไวรัส Influenza (H5N1) ในสัตว์ปีก และรายงานการติดเชื้อสายพันธุ์นี้จากสัตว์ปีกไปสู่คนในช่วงระหว่างปี ค.ศ. 2004-2005 ก่อให้เกิดความกังวลไปทั่วโลกว่าไวรัสสายพันธุ์นี้อาจเกิดกลายพันธุ์และสามารถแพร่เชื้อระหว่างมนุษย์ และเกิดการระบาดไปทั่วโลก (pandemic) การใช้วัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อกรณีมีการระบาดเกิดขึ้น ถือเป็นวิธีการหลักซึ่งจะช่วยลดความสูญเสียต่อชีวิตและทรัพย์สินของประชากรโลกได้

องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้พยายามสนับสนุนและส่งเสริมให้ทั้งภาครัฐและเอกชนในประเทศต่างๆ เพิ่มศักยภาพในการผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัส H5N1 สำหรับมนุษย์ เพื่อให้แน่ใจว่าหากมีการระบาดเกิดขึ้นจะมีวัคซีนเพียงพอที่จะใช้ทั้งในประเทศผู้ผลิต รวมถึงประเทศกำลังพัฒนาอื่นๆ ที่สามารถซื้อวัคซีนในราคาที่เหมาะสมได้ โดยปัจจุบันหลายประเทศทั้งแถบอเมริกาเหนือ และประเทศในแถบยุโรป ได้เริ่มเตรียมการผลิตวัคซีน H5N1 และทำการทดสอบประสิทธิภาพเพื่อที่จะนำมาใช้ อย่างไรก็ตาม องค์การอนามัยโลกประเมินว่าหากมีการระบาดของไวรัสนี้ไปทั่วโลกจริง วัคซีนเหล่านี้อาจมีไม่เพียงพอที่จะไปถึงประชากรประเทศกำลังพัฒนาทั้งหลายโดยเฉพาะในช่วงแรกของการระบาด ดังนั้นประเทศกำลังพัฒนาทั้งหลาย รวมทั้งประเทศไทยมีความจำเป็นต้องมีการเตรียมความพร้อมทางด้านเทคโนโลยีและกระบวนการผลิตวัคซีนชนิดนี้ โครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาเพื่อเตรียมความพร้อมในการผลิตวัคซีนสำหรับไวรัส influenza (H5N1) โดยศึกษาเพื่อผลิตวัคซีนในรูปแบบของการใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน (recombinant protein) ของไวรัส Influenza (H5N1) โดยเฉพาะโปรตีนชนิด Hemagglutinin หรือ HA ซึ่งผลิตจาก Baculovirus Expression System

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษากระบวนการผลิต Recombinant protein HA ของไวรัส Influenza (H5N1) โดยใช้ Baculovirus Expression System เพื่อเตรียมการพัฒนาวัคซีนไขหวัด/ไขหวัดนก

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. การทำพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) แบคทีเรียไวรัส เพื่อให้มียีนของไวรัส influenza ส่วน Hemagglutinin หรือ HA gene
2. การผลิต recombinant HA protein โดยใช้แบคทีเรียไวรัสที่มี HA gene เป็นส่วนหนึ่งของจีโนมมา infect เข้าสู่เซลล์แมลงในระบบ cell culture
3. ทำการตรวจสอบ recombinant HA protein ด้วยวิธีการ Western blot analysis
4. การสกัด recombinant HA protein ให้บริสุทธิ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

แบคทีริโอไวรัสที่ผ่านกระบวนการพันธุกรรมจากโครงการนี้ สามารถนำไปใช้ขยายขนาดการผลิต recombinant HA protein ได้เป็นจำนวนมาก โดยหากสามารถขยายขนาดการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงที่เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตโปรตีนในระดับโรงงานต้นแบบ จะสามารถผลิตโปรตีนเป้าหมายได้เป็นจำนวนมาก และสามารถนำไปทดสอบความเหมาะสมในการใช้เป็นวัคซีนในการทดลองระยะต่อไป ดังนั้นผู้นำนับแบคทีริโอไวรัสและเทคโนโลยีการผลิต recombinant protein ที่ได้จากงานวิจัยนี้ไปใช้คือโรงงานต้นแบบ ของสถาบันอบรมและพัฒนาโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ซึ่งปัจจุบันได้เริ่มดำเนินการก่อสร้างโรงงานต้นแบบสำหรับการผลิต therapeutic proteins ในระดับมาตรฐาน GMP ซึ่งสามารถใช้โปรตีนจากการศึกษานี้เป็นโครงการต้นแบบได้ หากสามารถผลิตโปรตีนชนิดนี้ได้มาตรฐานและทดสอบว่าใช้เป็นวัคซีนได้จริง ประเทศไทยจะมีวัคซีนสำรองจากเทคโนโลยีนี้อีกส่วนหนึ่ง

1.5 หน่วยงานที่จะนำผลประโยชน์

สามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตเพื่อนำไปขยายขนาดการผลิตในโรงงานต้นแบบ ของสถาบันอบรมและพัฒนาโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

1.6 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง

จากการระบาดของไวรัสไข้หวัดนกเมื่อปี พ.ศ. 2547 ทำให้ประเทศไทยได้รับผลกระทบอย่างมาก โดยเกษตรกรผู้เลี้ยงไก่สูญเสียรายได้จำนวนมหาศาล และที่สำคัญมีรายงานผู้ป่วยติดเชื้อจากการสัมผัสกับสัตว์ที่เป็นโรคในประเทศไทยและอีกหลายประเทศในแถบเอเชีย โดยพบว่าผู้ป่วยมีเปอร์เซ็นต์ในการสูญเสียชีวิตสูงมากโรคหนึ่ง และจากการที่ปี พ.ศ. 2548 นี้ ได้เริ่มมีการระบาดของไข้หวัดนกอีกครั้งในประเทศไทย และแถบเอเชียรวมทั้งยังขยายวงกว้างไปยังยุโรป ทำให้เริ่มมีการวิตกว่า หากจำนวนผู้ติดเชื้อมากขึ้น ผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อของคนและสัตว์ปีกพร้อมกัน อาจเป็นแหล่งสำหรับการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมของไวรัสจากสัตว์ปีกกับไวรัสจากคนที่เรียกว่า “Mixing vessel” อาจมีผลทำให้เกิดเชื้อที่รุนแรงและสามารถติดต่อยุติระหว่างคนที่อาจระบาดไปทั่วโลก (pandemic) เช่นเดียวกับการระบาดของไข้หวัดใหญ่หลายครั้งในอดีต เช่น Spanish flu หรือ Hong Kong flu ได้

จากเหตุผลดังกล่าวทำให้ต้องมีการเฝ้าระวังและเตรียมความพร้อมในการป้องกันและแก้ไขการระบาดของไวรัสชนิดนี้ แนวทางหนึ่งคือ การเตรียมพร้อมในเรื่องการผลิตวัคซีน สำหรับประเทศไทยนั้นแม้ว่ายังไม่มีการใช้วัคซีนทั้งในสัตว์และในคนก็ตาม แต่หลายประเทศ เช่น จีนได้เริ่มใช้วัคซีนในสัตว์ปีกเพื่อหยุดปัญหาการระบาดของไวรัส ดังนั้นประเทศไทยจึงต้องมีการเตรียมความพร้อมในเรื่องการผลิตวัคซีนไว้กรณีมีความต้องการใช้ ในกรณีมีการระบาดใหญ่ซึ่งอาจไม่มีวัคซีนเพียงพอที่จะจำหน่ายในประเทศที่ไม่มีกำลังการผลิตที่มีอยู่ทั่วโลก

ไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Influenza virus)

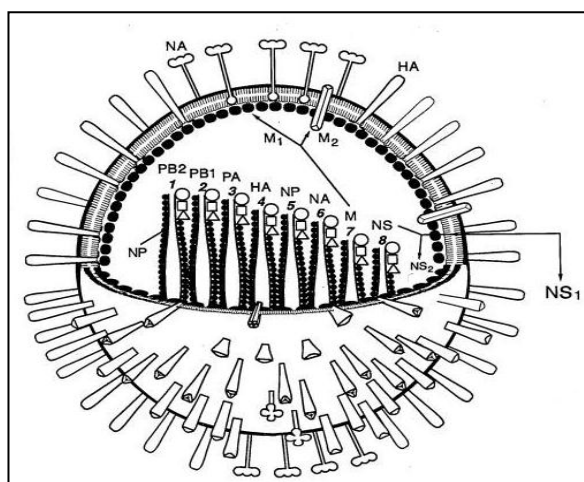
ไวรัสไข้หวัดใหญ่ จัดอยู่ในแฟมิลี Orthomyxoviridae ประกอบด้วยสารพันธุกรรมแบบอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวเส้นลบ ซึ่งมีลักษณะแยกกันเป็นท่อน (segmented RNA) จีโนมของไวรัสมีทั้งหมด 8

ชั้นย่อย ใช้ในการสร้างโปรตีนทั้งหมด 10 ชนิด คือ PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M1, M2, NS1 และ NS2 (รูปที่ 1.1 และตารางที่ 1)

ไวรัสไข้หวัดใหญ่สามารถแบ่งได้ เป็น 3 serotype ได้แก่ ไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิด A (Influenza A) ชนิด B (Influenza B) และชนิด C (Influenza C) ไวรัสที่ก่อโรคในมนุษย์ได้บ่อยและรุนแรงคือไวรัสชนิด A ซึ่งยังสามารถแบ่งย่อยต่อไปได้อีกหลาย subtype ตามชนิดของโปรตีนที่อยู่บนผิวของไวรัส คือ hemagglutinin (HA) ซึ่งมี 16 ชนิด และ neuraminidase (NA) ซึ่งมี 9 ชนิด ซึ่งการผสมผสานระหว่าง HA และ NA โปรตีนชนิดต่างกัน ทำให้ได้ไวรัสที่มี subtype ที่ต่างกัน

Influenza A virus

ไวรัส influenza A ที่มีการติดเชื้อในคน หรือ “human influenza virus” นั้น มี 3 subtype ซึ่งก่อให้เกิดการระบาดไปทั่วโลก (pandemic) ได้แก่ H1N1 ก่อให้เกิด Spanish flu ในช่วง ค.ศ.1918-1919, H2N2 สาเหตุของ Asian flu ในปีค.ศ.1957-1958 และ H3N2 สาเหตุของ Hong Kong flu ค.ศ.1968-1969 [3]



รูปที่ 1.1 โครงสร้างของ influenza virus ส่วนผิวประกอบด้วยโปรตีนหลัก 3 ชนิด ได้แก่ hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA) และ matrix protein 2 (M2) ฝังอยู่ในชั้นไขมัน (lipid bilayer) ซึ่งปกคลุม matrix protein 1 (M1) ซึ่งล้อมรอบแกนกลางของไวรัส ซึ่งภายในประกอบด้วยสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ 8 ท่อนที่จับกับ nucleoprotein (NP) และเอ็นไซม์โพลีเมอเรส 3 ชนิด (PB1, PB2 และ PA) [4]

ตารางที่ 1.1 ส่วนประกอบของโปรตีนของไวรัสไข้หวัดใหญ่ [5]

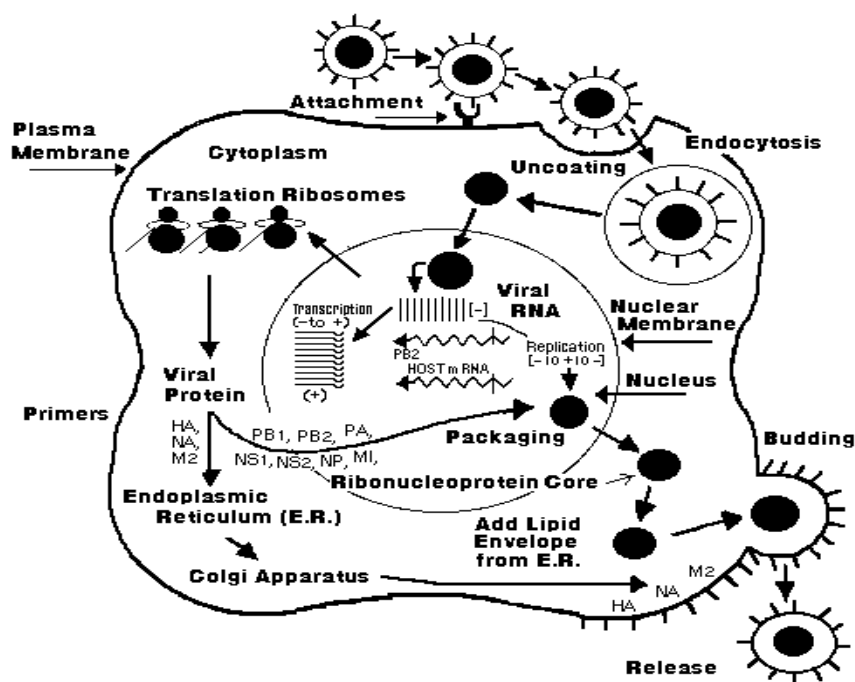
Segment	Polypeptides	Function
1	PB2	องค์ประกอบของ polymerase
2	PB2	องค์ประกอบของ polymerase
3	PA	องค์ประกอบของ polymerase
4	HA	hemagglutinin สำหรับการเกาะของไวรัสบนผิวเซลล์ เป็น fusion protein และเป็นโปรตีนเป้าหมายของแอนติบอดีที่จำเพาะ
5	NP	nucleocapsid
6	NA	เอนไซม์ neuraminidase ตัด sialic acid และช่วยปลดปล่อยอนุภาคของไวรัสใหม่ออกจากเซลล์
7	M1	matrix protein : โครงสร้างของไวรัสเกี่ยวข้องกับ nucleocapsid และ envelope เสริมกระบวนการ virus assembly
	M2	membrane protein : ทำให้เกิด membrane channel ช่วยในกระบวนการ uncoating และการสังเคราะห์ hemagglutinin
8	NS1	non-structural protein ยับยั้ง mRNA translation ของเซลล์เจ้าบ้าน
	NS2	non-structural protein ยังไม่ทราบหน้าที่

การ infection

Influenza virus มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายลบที่เป็นท่อน (negative-sense fragmented RNA) ซึ่งเกาะกับ nucleoprotein เรียกว่า ribonucleoprotein (RNP) ซึ่งมีการจำลองตัวในนิวเคลียสของเซลล์เจ้าบ้าน การ infection เริ่มจากไวรัสเกาะกับ receptor ของเซลล์และผ่านเข้าเซลล์โดยการ fusion เข้ากับเซลล์เมมเบรนโดยกระบวนการ receptor-mediated endocytosis หลังจากนั้นสารประกอบ ribonucleoprotein complex (vRNP complex) ซึ่งประกอบด้วย อาร์เอ็นเอของไวรัส (vRNA) นิวคลีโอโปรตีน (nucleoprotein, NP) และโปรตีนโพลีเมอเรสอีก 3 ชนิด (PB2, PB1 และ PA) จะถูกส่งผ่านเยื่อหุ้มนิวเคลียสเพื่อการจำลองตัว (replication) และการ transcription ภายในนิวเคลียส ในขั้นตอนการจำลองสายอาร์เอ็นเอนั้น vRNA จะถูกใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ อาร์เอ็นเอที่เป็นคู่สม (cRNA) ขึ้นมาก่อน จากนั้นจึงจะใช้ cRNA เป็นต้นแบบในการ

สังเคราะห์ vRNA สำหรับ progeny ของไวรัสอีกที นอกจากนี้ vRNA ยัง ถูกใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ mRNA เพื่อใช้สังเคราะห์โปรตีนของไวรัส โดย vRNA จะถูกหุ้ม(encapsudate) ด้วย nucleoprotein และถูก transcribe เพื่อสังเคราะห์ mRNA โดยเอ็นไซม์โพลีเมอเรสของไวรัส [6] รายละเอียดตามรูปที่ 2 ดังนั้น องค์ประกอบที่จำเป็นสำหรับการเพิ่มจำนวนของไวรัส influenza นั้นคือ vRNP complex สำหรับอาร์เอ็นเอแต่ละท่อน ซึ่งต้องใช้จำนวน 8 vRNP complex สำหรับ influenza A

Influenza A Virus Replication



รูปที่ 1.2 การเพิ่มจำนวนของไวรัสในเซลล์เจ้าบ้าน หลังจากไวรัสเกาะกับ receptor ที่มี sialic acid เป็นองค์ประกอบ แล้วจะผ่านเข้าสู่เซลล์โดยกระบวนการ endocytosis และ fuse ผ่านผนังของ vesicle จากนั้น vRNP complex จะผ่านเข้าสู่นิวเคลียส เกิดกระบวนการ transcription สังเคราะห์ mRNA และ cRNA โดย mRNA จะถูกส่งออกไปยังไซโตพลาสซึมเพื่อการสังเคราะห์โปรตีนของไวรัส ส่วน cRNA ถูกใช้เป็นต้นแบบในการ replication สร้าง vRNA โปรตีนที่ได้รับการสังเคราะห์ในไซโตพลาสซึม PB1, PB2, PA และ NP จะถูกส่งเข้าไปในนิวเคลียส เข้าไปประกอบเป็น vRNP complex ก่อนที่จะส่งออกมาอยู่ร่วมกับโปรตีน M1 และ M2 ส่วนโปรตีน hemagglutinin และ neuraminidase มีเป้าหมายอยู่บนผิวของเซลล์ และประกอบเป็นส่วนหนึ่งของไวรัสเมื่อมีการ budding ออกนอกเซลล์ [5]

การผลิตโปรตีนโดยใช้ Baculovirus Expression System

ในระบบนี้ใช้ 2 องค์ประกอบหลัก คือ

เซลล์เจ้าบ้าน

ได้แก่ เซลล์ไลน์ ซึ่งเป็นเซลล์แมลงที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของแมลง เช่น รังไข่ และสามารถเจริญได้ในอาหารสังเคราะห์ทั้งที่มีส่วนผสม (Serum containing medium) หรือไม่มีส่วนผสม (serum free medium) โดยเซลล์แมลงสามารถเจริญได้ไม่สิ้นสุด (continuous culture) เซลล์ไลน์ที่ใช้ผลิต recombinant protein นั้นมีทั้งที่เจริญแบบเซลล์เดี่ยวแบบแขวนลอย (suspension cell) และเจริญโดยเกาะกับพื้น (attached cell) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 27°C

แบคคิลโลไวรัส

แบคคิลโลไวรัส เป็นไวรัสที่มีความจำเพาะสูงต่อแมลง ไม่มีอันตรายต่อพืชและสัตว์มีกระดูกสันหลัง แบคคิลโลไวรัสที่นิยมใช้ในการผลิต Recombinant protein คือ *Autographa californica* MNPV (AcMNPV) เนื่องจากปัจจุบันมีข้อมูลทางด้านพันธุกรรมของไวรัสสายพันธุ์นี้อย่างสมบูรณ์ และที่สำคัญคือสามารถ infect เข้าสู่เซลล์แมลงได้มากชนิด (มากกว่า 30 สปีชีส์) ทำให้สะดวกในการเลือกใช้เซลล์เจ้าบ้านชนิดต่างๆ

แบคคิลโลไวรัสมี Strong promoter ที่สำคัญ คือ polyhedrin promoter สามารถควบคุมให้เซลล์แมลงสังเคราะห์โปรตีน ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ทั้งสองในปริมาณมากถึง 50% ของโปรตีนทั้งหมดที่เซลล์แมลงสังเคราะห์ขึ้น ทำให้โปรตีนที่ถูกผลิตในระบบนี้มีปริมาณสูง จึงทำให้ออกมาได้อย่างแพร่หลาย

การผลิตวัคซีน influenza โดย Baculovirus Expression Insect Cell System

ในปี ค.ศ. 1999 Smith และคณะ ในนามของบริษัท Protein Sciences Corporation (Meriden, CT) ได้ยื่นขอจดสิทธิบัตรการผลิตวัคซีนสำหรับไวรัส influenza โดยใช้ระบบการผลิต Baculovirus Expression Insect Cell System ซึ่งทำการผลิต โปรตีนส่วนประกอบของไวรัส influenza 2 ส่วน คือ recombinant hemagglutinin protein และ recombinant neuraminidase protein โดยนำยีนมาทำการตัดต่อพันธุกรรมเข้ากับพันธุกรรมของแบคคิลโลไวรัส และนำแบคคิลโลไวรัสที่มียีนของไวรัส influenza มา infect เข้าสู่เซลล์แมลง ทำให้เซลล์แมลงมีการผลิตโปรตีนแต่ละชนิด จากนั้นได้นำเซลล์แมลงที่มีการผลิตโปรตีนที่ต้องการ มาทำการสกัดแยกโปรตีนที่เป็น recombinant hemagglutinin protein หรือ recombinant neuraminidase protein ออกจากโปรตีนของเซลล์แมลง และนำโปรตีนผลิตภัณฑ์ที่ได้ (ชื่อทางการค้า คือ “FluBlok”) ไปทดสอบคุณสมบัติการเป็นวัคซีนทั้งในผู้ใหญ่ที่สุขภาพดี และผู้สูงอายุ โดยได้ผลดีใน clinical trial phase I และ phase II/III โดยการใช้ dose ที่ 45 µg ของแต่ละ HA antigen ของ trivalent vaccine นั้นให้ประสิทธิภาพ 100% (จากการตรวจสอบ โดยใช้ วิธี culture-positive influenza) โดยในปี 2005 ได้รับการยอมรับจาก FDA ให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในเงื่อนไข “accelerated approval” และคาดว่าจะนำออกจำหน่ายภายในปี 2006 หรือไม่เกินช่วงการระบาดของ influenza สำหรับปี 2007/2008 [7]

คณะผู้วิจัยกลุ่มนี้ยังได้ทำการนำเทคโนโลยีนี้มาทำการผลิตวัคซีน H5N1 และได้นำมาทดสอบกับไก่ พบว่าให้ผลการป้องกันโรค 100% เมื่อใช้ที่ dose สูง โดยที่ไม่มีไก่ที่ป่วยหรือตาย และที่สำคัญ

วัคซีนในรูปแบบนี้ไม่ทำให้ไก่มีการผลิตไวรัส (shed) ออกมาในมูลไก่ที่จะเป็นสาเหตุในการระบาดต่อ ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบในการผลิตวัคซีนสำหรับ pandemic

นอกจากการใช้ระบบแบคทีเรียไวรัสในการผลิตวัคซีนในรูปแบบของ recombinant protein แล้ว Galarza และคณะ [8] ยังได้ใช้ระบบนี้ในการผลิตวัคซีนในรูปแบบ “Influenza virus like particle” หรือ VLPS โดยการใช้แบคทีเรียไวรัสที่มีการทำพันธุวิศวกรรม ให้มีเยื่อของไวรัส influenza 4 ยีน คือ HA, NA, M1 และ M2 โดยให้มีการสร้าง recombinant protein ทั้ง 4 ชนิด บนผิวของเซลล์แมลง และได้ทดลองนำ VLP (ที่ประกอบด้วย M1 และ HA) ไปทดสอบกับหนูพบว่าให้ผลป้องกันการ infection จากไวรัส H3N2 ได้ผลดี สำหรับการผลิตวัคซีนในรูปแบบนี้มีบริษัท NOvavax, Inc เป็นผู้ที่จะพัฒนากระบวนการผลิตวัคซีนในรูปแบบนี้

ข้อดีของการใช้ระบบ Baculovirus Expression Insect Cell System

1. ไม่มีปัญหาในด้านการแพ้โปรตีนจากไข่ไก่ ซึ่งอาจขึ้นกับผู้ที่ใช้วัคซีนที่ผลิตจากไข่ไก่พัก เนื่องจาก recombinant vaccine ที่ผลิตได้มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง
2. แบคทีเรียไวรัสและเซลล์แมลง มีความปลอดภัยต่อมนุษย์
3. การผลิตทำได้ง่ายกว่าการผลิต whole virus particle เนื่องจากเป็น subunit vaccine จึงไม่ต้องกังวลในด้านระบบความปลอดภัยในขณะผลิต และไม่ต้องใช้ระบบ Biosafety level 2 หรือ 3 และการขยายขนาดระดับอุตสาหกรรมมีความเป็นไปได้สูง เนื่องจากระบบนี้มีการใช้ในการผลิต recombinant vaccine ชนิดอื่นๆ อยู่แล้ว
4. เทคโนโลยีที่พัฒนาในระบบนี้สามารถนำมาใช้ผลิต recombinant vaccine จาก strain ที่กำลังระบาดได้ทันที และใช้ line ในการผลิต strain ต่างๆแบบเดียวกัน
5. ไม่ต้องกังวลในด้าน genetic heterogeneity ซึ่งหากทำในไข่ต้องมีการตรวจสอบอย่างเข้มงวด เนื่องจากต้องมีการ passage ไวรัสในไข่ไก่อย่างต่อเนื่อง
6. วัคซีนที่ได้ไม่ต้องผ่านกระบวนการ inactivate ดังเช่น การผลิต whole virus particle ดังนั้นจึงไม่ปนเปื้อนสารเคมีที่ใช้ในการ inactivate ไวรัส

ข้อจำกัดของการใช้ระบบ Baculovirus Expression Insect Cell System

1. อาหารเลี้ยงเซลล์แมลงมีราคาค่อนข้างแพง โดยแพงกว่าอาหารเลี้ยงเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม
2. เซลล์แมลงมีกระบวนการ post translation modification ที่ต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงต้องมีการตรวจสอบคุณสมบัติของ recombinant vaccine อย่างเข้มงวด อย่างไรก็ตามผลการศึกษา recombinant influenza vaccine ใน clinical trial ที่ผ่านมาให้ผลดีมาก แสดงว่า recombinant vaccine จากระบบนี้ใช้ได้ดี ไม่มีปัญหาจากความแตกต่างของกระบวนการ post translation modification ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

ศักยภาพของการใช้ Baculovirus Expression Insect Cell System ในการผลิตวัคซีนสำหรับ influenza

ได้มีการรายงานการผลิต recombinant HA protein เพื่อใช้เป็นวัคซีนสำหรับไวรัส influenza ดังนี้

1. Wang K. และคณะ [9] ผลิตและสกัด recombinant HA protein จากเซลล์แมลง ได้บริสุทธิ์ถึง 99% ในปริมาณ 6.4 mg HA protein จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงในถังหมัก 15 ลิตร ซึ่งหากคำนวณจาก dose ของปริมาณ recombinant HA protein ที่สูงสุดคือ 135 mg/dose จะพบว่าจะสามารถผลิตวัคซีนได้ประมาณ 1,500 dose ต่อการผลิตโดยการเลี้ยงเซลล์แมลงในถังหมักขนาด 500 ลิตร อย่างไรก็ตาม ข้อมูลนี้เป็นการประเมินคร่าวๆ จากรายงานที่ตีพิมพ์ในวารสาร คณะผู้วิจัยกลุ่มนี้ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ บริษัท Protein Sciences ที่เป็นเจ้าของลิขสิทธิ์ในการผลิตนี้ น่าจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตได้ดีกว่านี้
2. New N และคณะ [10] รายงานว่าสามารถผลิต recombinant HA protein จาก H5N1 ได้จากเซลล์แมลง โดยผลิตได้ 68 mg จากเซลล์แมลงที่เพาะเลี้ยงปริมาตร 1 ลิตร ซึ่งปริมาณนี้ยังไม่ได้ผ่านการสกัดให้บริสุทธิ์

การผลิต Recombinant HA protein โดยใช้ Baculovirus Expression System

ในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาเพื่อผลิต Recombinant HA protein ในระบบ Baculovirus Expression System ซึ่งได้มีการรายงานจากการศึกษาที่ผ่านมาแล้วว่าสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้สามารถป้องกันการ infection ของไวรัส influenza [7] เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเตรียมความพร้อมในการรับมือการระบาดของไข้หวัดสำหรับประเทศไทย โดยมีขั้นตอนการดำเนินการประกอบด้วย

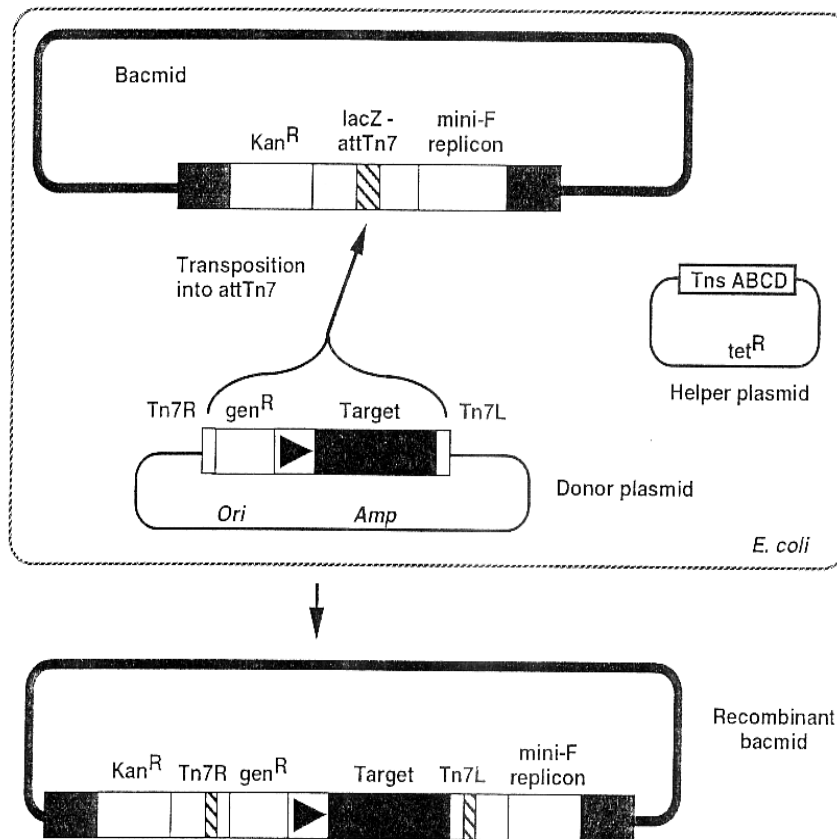
ก. การทำ Genetic-engineered baculovirus

การทำ Genetic-engineered baculovirus เป็นการทำพันธุวิศวกรรมของแบคทีเรียไวรัสเพื่อให้มียีนใหม่เพิ่มเข้าไปเป็นส่วนหนึ่งของ genome ของแบคทีเรียไวรัส และใช้ไวรัสมา infect เข้าสู่เซลล์แมลงเพื่อผลิต recombinant protein โดยหลักการ cloning เข้าสู่ baculovirus มีได้ 4 แบบหลักๆ คือ การ Homologous recombination Site specific recombination Direct ligation และการใช้ Shuttle vector เป็นต้น ในการศึกษานี้จะเลือกใช้ Shuttle vector แบบใช้กับ *E. coli*

***E. coli*-based baculovirus shuttle vector**

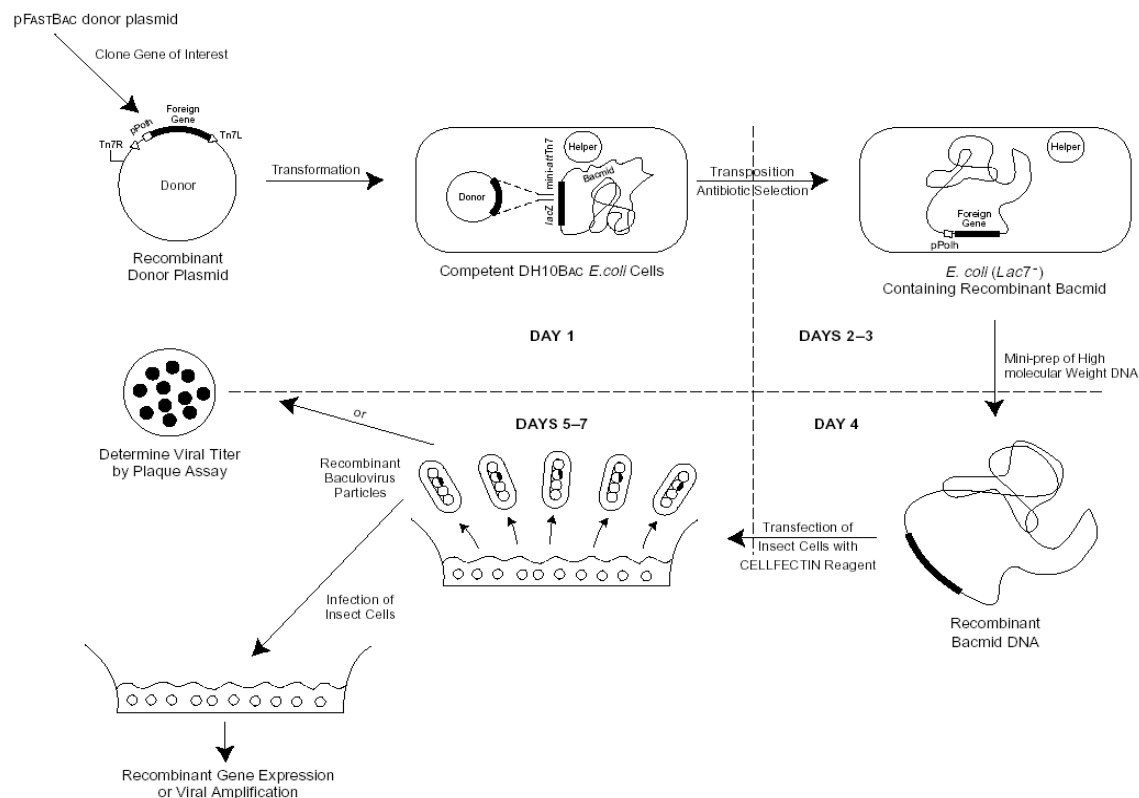
E. coli-based baculovirus shuttle vector เป็น baculovirus shuttle vector ที่สามารถเพิ่มจำนวน DNA ของแบคทีเรียไวรัสได้ใน *E. coli* เนื่องจากการเพิ่มเติมส่วน mini F-replicon ให้เป็นส่วนหนึ่งของ shuttle vector โดยเทคนิคนี้ใช้การเตรียมใน transfer vector และส่งผ่านไปยัง baculovirus shuttle vector โดยเริ่มจากการตัดสารพันธุกรรมที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่ต้องการเข้าสู่พลาสมิด ซึ่งมียีนต้านยาปฏิชีวนะ gentamicin มี polyhedrin promoter และ SV 40 poly (A) อยู่ระหว่าง mini attachment site Tn 7 ทั้งสองข้าง เพื่อใช้เป็น donor plasmid หลังจากนั้นทำการส่งถ่ายสารพันธุกรรมจาก donor plasmid ไปสู่ competent *E. coli* DH10Bac cells ซึ่งภายในเซลล์นี้ประกอบด้วย baculovirus shuttle vector (Bacmid) ที่มี mini F replicon และ *lacZ* gene ของ *E. coli* ยีนที่ต้านยาปฏิชีวนะ kanamycin และ *att* Tn7 ซึ่งเป็น attachment site สำหรับแบคทีเรีย และในเซลล์

E. coli นี้ยังมี helper plasmid ที่เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ transposase ที่ใช้ในกระบวนการ transposition ภายหลังกระบวนการ transformation ของ donor plasmid ที่มีอินที่ที่ต้องการอยู่เข้าสู่ competent *E. coli* DH10Bac cells นั้นจะเกิดการส่งถ่าย mini Tn7 จาก donor plasmid เข้าไปสู่ mini att Tn7 ทั้งสองข้างบน bacmid ใน competent *E. coli* DH10Bac cells ได้อย่างง่ายและมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะไปขัดขวางการแสดงออกของ *lacZ* gene ดังรูปที่ 1.3



รูปที่ 1.3 การใช้ *E. coli*-based baculovirus shuttle vector โดยการเตรียมชั้นยีนผ่าน transfer vector โดยมี Mini-attTn7 และ Mini-F-replicon เป็นบริเวณให้ยีนแทรก [11]

เมื่อนำ *E. coli* DH10Bac cells ที่ผ่านการทำ transformation แล้วไปเลี้ยงบน LB agar plate ที่มียา gentamicin kanamycin tetracycline X-gal และ IPTG จะทำให้ได้โคโลนีสีขาวที่มีการนำอินที่ที่ต้องการเข้าสู่ bacmid แล้ว หลังจากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่มีคุณสมบัติตามต้องการแล้วจึงนำโคโลนีของ *E. coli* DH10Bac cells นี้ไปเลี้ยงต่อเพื่อเพิ่มจำนวน recombinant bacmid และนำไปทำการ transfection เข้าสู่เซลล์แมลงเพื่อให้ได้ recombinant baculovirus ที่สมบูรณ์ เพื่อที่จะได้นำไป infect เข้าสู่เซลล์แมลงเพื่อผลิตโปรตีนที่ต้องการต่อไป ดังรูปที่ 1.4



รูปที่ 1.4 ขั้นตอนการผลิต recombinant protein โดยใช้ Bac-to-Bac (Instruction Manual, Life Technology)

ข. การผลิต Recombinant HA protein ในเซลล์แมลง

การผลิต recombinant HA protein ในเซลล์แมลงจะทำโดยใช้แบคทีริโอไวรัสที่ผ่านกระบวนการพันธุวิศวกรรมเพื่อนำ Hemagglutinin หรือ HA gene เข้าไปอยู่ในจีโนมของแบคทีริโอไวรัสแล้ว อยู่ในรูปของ extracellular virus (ECV) มาทำการ infect เซลล์ และผลิต recombinant HA protein ภายใต้สภาวะที่ควบคุมได้ โดยการผลิตไวรัสในเซลล์แมลงเป็นการผลิตภายใต้สภาวะที่ปลอดภัยใน tissue culture flask หรือ ในถังปฏิกรณ์ จึงปราศจากการปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ recombinant HA protein ที่ถูกผลิตจากเซลล์แมลงจะถูกผลิตบนผิวเซลล์แมลง ซึ่งสามารถสกัดให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปทดสอบความเหมาะสมในการเป็นวัคซีนได้

บทที่ 2

ระเบียบวิธีการวิจัย

2.1 การเลี้ยงเซลล์แมลง

การเพาะเลี้ยง *Spodoptera frugiperda* (Sf-9 cell) ในลักษณะที่เป็น suspension cell culture จะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว Graces' medium (Gibco) ผสมกับ 10%FBS เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 rpm ที่อุณหภูมิ 27°C จนเซลล์เจริญเต็มที่ โดยการสังเกตจากลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ว่ามีรูปร่างกลมเสมอกันและเมื่อเซลล์มีความหนาแน่นประมาณ 3.5×10^6 cells/ml ซึ่งอยู่ในช่วง mid log phase จึงทำการถ่ายเซลล์ (passage) ลงไปในอาหารใหม่โดยทำการนับเซลล์ และเตรียมให้มีความหนาแน่นเริ่มต้น 3×10^5 cells/ml และนำเซลล์ไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 120 rpm เช่นเดิม สำหรับการถ่ายเซลล์นั้นจะถ่ายเซลล์ทุก 3 วัน

2.2 การเตรียมแบคทีเรียไวรัส

เริ่มจากการเตรียมเซลล์ในขวดรูปชมพู่ (shake flask) ขนาด 250 ml ให้มีความหนาแน่นเซลล์ 5×10^5 cells/ml ปริมาตร 50 ml แล้วนำไวรัสที่ทำการหา titer แล้วมา infect เซลล์ที่เตรียมไว้โดยใช้อัตราส่วนของไวรัสต่อเซลล์เท่ากับ 1 (MOI=1) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 27°C ความเร็วในการเขย่า 120 rpm เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่าง cell suspension ทั้งหมดนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 9,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C นำส่วนของ supernatant ที่มี ECV อยู่ไปหา titer และใช้เป็น stock ไวรัสสำหรับการ infect เซลล์แมลงหรือใช้เป็นไวรัสตั้งต้น (stock ไวรัส passage number ที่ 1, P1) สำหรับการทำ serial passage

2.3 plaque assay

การทำ plaque assay มีวัตถุประสงค์ 2 ประการ คือ เพื่อการแยกไวรัสให้บริสุทธิ์และเพื่อหา titer ของไวรัส โดยมีหลักการคือ ไวรัส 1 particle จะเข้าทำลายเซลล์ในระยะเริ่มต้นและต่อมาเมื่อไวรัสเพิ่มจำนวนและ budding ออกจากเซลล์และ infect เข้าสู่เซลล์ข้างเคียง เซลล์ที่ถูก infect จะแตกเป็นวงกว้าง (clear zone) เรียกว่า plaque และเมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์ส่องดูจะเห็นผลึกไวรัสจำนวนมาก โดย 1 plaque ที่ปรากฏเทียบเท่ากับปริมาณไวรัส 1 particle โดยวิธีการทดลองดังนี้ เตรียมเซลล์แมลงที่อยู่ในช่วง log phase ให้มีความหนาแน่น 1.2×10^6 cells/ml ลงใน petri-dish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 ซม. และนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 27°C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะพื้น Petri-dish ในระหว่างนั้นนำตัวอย่างไวรัสมาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีความเข้มข้นเหมาะสม (ด้วยการทำ 10-fold dilution) เมื่อครบเวลา ดูดอาหารออกจาก petri-dish ออก แล้วเติมไวรัสที่มีความเข้มข้นต่างๆ ที่ทำการเจือจางไว้แล้ว จำนวน 1 ml ต่อ 1 petri-dish โดยแต่ละความเข้มข้นจะทำการอย่างน้อย 2 ข้าง จากนั้นนำ Petri-dish ที่เติมไวรัสแล้วมาบ่มบนเครื่อง rocking plate เพื่อให้ไวรัสสัมผัสกับเซลล์ได้ดีให้หมุนเปลี่ยนทิศทางการ rocking ทุกๆ 1 ชั่วโมง นาน 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาดูดไวรัสออกแล้วเททับด้วย 1.5 % agarose (ภาคผนวก 1) ที่ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 10% FBS ปริมาตร 4 ml จากนั้นปล่อยให้ agarose แข็งตัว จึงเก็บ petri-dish ลงในกล่องที่สะอาดและรองด้วยกระดาษทิชชู

ขึ้นเพื่อไม่ให้ petri-dish แห้งแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 27°C นานประมาณ 6-7 วัน นำมาแยกไวรัส โดยการแยก plaque หรือตรวจนับจำนวน plaque ที่เกิดขึ้นภายใต้กล้อง inverted microscope แล้ว คำนวณความเข้มข้นของไวรัสซึ่งมีหน่วยเป็น plaque forming unit/ ml (pfu/ml)

2.4 การเพิ่มจำนวนไวรัสหลังจากการแยกไวรัสให้บริสุทธิ์

เตรียมเซลล์ลงใน 24-well plate ให้มีความหนาแน่น 3×10^5 cells/ml ปริมาตร 1 ml ต่อ 1 หลุม เลือก plaque ที่ได้จากการทำ plaque assay ในข้อ 2.4 โดยเลือก plaque เดี่ยวๆ แยกจาก บริเวณอื่นอย่างชัดเจนและมีเซลล์ที่ถูก Infect เป็นบริเวณกว้างและใช้ pipet tip ดูด agarose บริเวณ นั้นมาใส่ลงไปในเซลล์ที่เตรียมไว้ใน 24-well plate จากนั้นติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ทุกวัน เมื่อเซลล์ถูก infect ซึ่งเห็นการสร้างผลึกไวรัสในนิวเคลียสของเซลล์ จึงทำการเก็บตัวอย่างไวรัสใน อาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อนำไปเพิ่มจำนวนโดยเตรียมเซลล์ใน T flask ขนาด ให้มีความหนาแน่น 1.2×10^6 cells/ml จากนั้นจึงนำตัวอย่างไวรัสจาก 24-well plate ปริมาตร 1 ml ใส่ลงไปใน T flask และนำไป บ่มที่อุณหภูมิ 27°C ต่อไป จนสามารถเห็นการ infection ของเซลล์ เก็บตัวอย่างไวรัสไปหา titer โดย วิธี end point dilution และใช้เป็นไวรัสตั้งต้นสำหรับการเพิ่มจำนวนหรือเตรียม extracellular virus โดยการ infect ไวรัสลงในเซลล์แมลงที่เลี้ยงแบบ suspension culture ใน shake flask ต่อไป

2.5 การโคลนยีน HA เข้าสู่ Baculovirus Transfer Vector (pFastBacHT b)

ทำการเตรียม DNA ของยีน HA ด้วยการใช่วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยการ ออกแบบ primer ให้จำเพาะกับยีน HA และให้มี บริเวณตัดของเอนไซม์ บริเวณ 5' ของ primer ทั้ง 2 ข้างเพื่อการย้ายเข้าสู่ pFastBacHT b โดยมีรายละเอียดของ primer ดังนี้

Forward primer มี restriction site **BamHI**

5'- Cg ggA TCC ATg gAg AAA ATA gTg CTT CTT TTT gC - 3'

Reverse primer มี restriction site **HindIII**

5'- TA AAg CTT TTA AAT gCA AAT TCT gCA TTg TAA Cg -3'

ทำ PCR โดยใช้ pGEM-T-HA พลาสมิดเป็น DNA ต้นแบบ ใช้เอนไซม์ *pfu* polymerase โดยมี ส่วนผสมดังตารางที่ 1 และสภาวะที่ใช้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2.1 ส่วนผสมใน Reaction สำหรับ PCR

ส่วนผสม (μl)	ปริมาตร (μl)
DNA template (1 ng/μl)	3
Forward primer (10 pmole/μl)	1
Reverse primer (10 pmole/μl)	1
dNTPs mixed (25 mM)	0.4
MgCl ₂ (50 mM)	2
10 X Taq buffer	5

<i>pfu</i> polymerase (U)	1.25
Sterile distilled water	36.8
Total	50

ตารางที่ 2.2 สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR

Cycle ที่	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)
1 Incubation	93	3
Denaturation	95	0.45
Annealing	55	0.45
Extension	72	4
2-29 Denaturation	95	0.45
Annealing	55	0.45
Extension	72	4
30 Denaturation	95	0.45
Annealing	55	0.45
Extension	72	10

จากนั้นทำการนำ PCR product ที่ได้มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III จากนั้นนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pFASTBacHTb ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ทั้งสองเช่นเดียวกัน

2.6 การ transformation นำ plasmid (pFASTBacHTb-HA) เข้าสู่ competent *E. coli* cells (DH10Bac) แบบใช้สารเคมี โดยวิธี Heat shock

1. เติม plasmid DNA 1-5 μ l (1-5 μ g) ลงใน competent cell *E. coli* 200 μ l ใน polypropylene tube ผสมให้เข้ากันเบาๆ ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 30 นาที
2. นำมาทำ heat shock ที่อุณหภูมิ 42°C นาน 45 วินาที แล้วแช่ลงในน้ำแข็งทันที ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที
3. เติม LB medium (ภาคผนวก ข.1.1) หรือ S.O.C. medium (ภาคผนวก ข.1.3) 800 μ l นำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 rpm ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ 4,000 rpm นาน 60 วินาที ทิ้ง ส่วนใสข้างบนจนเหลือภายในหลอดประมาณ 100 μ l แล้วผสมให้เข้ากัน
4. เกลี่ยเชื้อ 100 μ l ลงในจานเพาะเชื้อ ขนาด 20 ml บน LB agar medium ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะซึ่งจำเพาะกับ plasmid หรือมี substrate ที่ plasmid ใช้ได้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ข้ามคืน เพื่อคัดเลือก transformant

2.7 การสกัด genomic baculovirus DNA (Bacmid)

1. เชี่ย *E. coli* colony ที่มี recombinant bacmid ที่ต้องการ 1 colony ลงใน LB medium ปริมาตร 5 ml ซึ่งมียาปฏิชีวนะ นำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 rpm ที่ 37 °C ข้ามคืน ปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว

- 14,000 rpm นาน 5 นาที เทและดูดส่วนใสทิ้งไปให้หมด เพื่อล้างเอา medium ออกจากเซลล์ นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาละลายด้วย solution I (0.15 M Tris, 0.1 M EDTA, 100 μ g Rnase A) ปริมาตร 300 μ l ผสมให้เข้ากันด้วยการปิเปตขึ้นและลง
2. เติม solution II (0.2 N NaOH และ 1%SDS) ปริมาตร 300 μ l ผสมให้เข้ากันแบบ inverting ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที (ไม่ควรนานเกิน 5 นาที)
3. เติม solution III (3 M potassium acetate pH 5.5) ปริมาตร 300 μ l ผสมให้เข้ากันแบบ inverting จะเห็นตะกอนสีขาวเกิดขึ้น ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 10 นาที
4. นำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 14,000 rpm นาน 15 นาที แล้วดูดส่วนใสเก็บไว้ ส่วนตะกอนสีขาวให้ทิ้งไป
5. นำส่วนใสมาเติม Isopropanol ปริมาตร 800 μ l ผสมให้เข้ากันแบบ inverting แล้วตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 5-10 นาที (ขั้นตอนนี้อาจเก็บทิ้งไว้ที่ -20°C)
6. ปั่นด้วยความเร็วรอบ 14,000 rpm นาน 15 นาที ทิ้งส่วนใสไป (จะสังเกตเห็นตะกอนติดอยู่ที่ก้นหลอด) และล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 μ l
7. ปั่นด้วยความเร็วรอบ 14,000 rpm นาน 5 นาที เท ethanol ทิ้ง
8. ปั่นด้วยความเร็วรอบ 14,000 rpm นาน 1 นาที แล้วดูด ethanol ที่เหลือออกให้หมด ตั้งทิ้งไว้ที่ 37°C นาน 10-15 นาที จนตะกอนแห้ง
9. ละลายตะกอนด้วย deionized water หรือ TE buffer (ภาคผนวก ข.3.1.13) ปริมาตร 50 μ l แล้วเก็บที่ -20°C อาจจะใช้ run agarose gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้น 1% agarose ใน TAE buffer (ภาคผนวก ข.3.2.3) เพื่อตรวจสอบ plasmid และการปนเปื้อนของโปรตีนและ RNA

2.8 การตรวจสอบ recombinant bacmid โดยใช้เทคนิค PCR

1. เตรียมคู่ primer ที่มีความจำเพาะต่อยีน HA หรือ M13 ที่ต้องการทำ PCR
2. เตรียมส่วนผสมสำหรับ PCR ดังตารางที่ 2.1
3. นำไปทำ PCR โดยเครื่อง Thermal Cycle โดยกำหนด 30 cycle ซึ่งใช้สภาวะตามตารางที่ 2.2
4. นำ PCR product ที่ได้ไป run agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้น 1% (w/v) agarose เพื่อดูขนาดของ PCR product ที่ได้

2.9 การนำ Recombinant bacmid DNA เข้าสู่เซลล์แมลงโดยวิธี Transfection

1. นำเซลล์แมลง SF-9 ที่อยู่ในช่วง log phase ลงใน petridish ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 mm ให้มีความหนาแน่นเซลล์ 3×10^6 cells/ml (SF-9) หรือ 1.2×10^6 cells/ml (Hz) ปริมาตร 1 ml ต่อ dish นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 27°C นาน 1 ชั่วโมง
2. เตรียม solution A โดยใช้ recombinant bacmid DNA 1-2 μ g ในปริมาตร 5 μ l นำมาเจือจางใน Graces' medium ปริมาตร 100 μ l ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml
3. เตรียม solution B ใช้ CellFECTIN (บริษัท Invitrogen) ปริมาตร 6 μ l ผสมใน Graces' medium ปริมาตร 100 μ l ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml

4. ผสม solution A และ solution B เข้าด้วยกัน และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15-45 นาที เติม Graces' medium ปริมาตร 800 μ l
5. นำเซลล์จากข้อ 1 มาล้างด้วย Grace's medium ปริมาตร 2 ml จำนวน 2 ครั้ง และเติมสารผสม solution A และ solution B จากข้อ 4 ลงใน dish นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 27°C นาน 5 ชั่วโมง
6. ดูดส่วนผสมทั้งหมดออกจาก dish และเติม Graces' medium ที่มี 3% FCS (v/v) ปริมาตร 2 ml แล้วเติม 100x antibiotic ปริมาตร 20 μ l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 27°C นาน 3-5 วัน หรือจนสังเกตเห็นการ infection ของแบคทีเรียไวรัส
7. เก็บส่วนใส (extracellular virus) ที่ได้จาก dish ไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อเป็น virus stock หรือเก็บไว้ที่ -20°C (มีเปอร์เซ็นต์ FCS 3-10% ใน medium) ในกรณีที่ต้องการเก็บไว้นานๆ โดยต้องการให้สูญเสียประสิทธิภาพใน infection น้อยที่สุด ส่วน infected insect cell สามารถนำไปสกัดเอา baculovirus DNA เพื่อตรวจสอบยืนยันที่สนใจด้วยวิธี PCR

2.10 การตรวจสอบการสร้าง recombinant hemagglutinin (HA) protein ด้วย Western blot analysis และ Dot blot analysis

ทำการเก็บเกี่ยวตัวอย่างโปรตีนที่คาดว่าจะมี VLP จากอาหารเลี้ยงเซลล์แมลงที่ถูก infect ด้วย recombinant baculovirus ตั้งแต่ 2-5 วัน มาปั่นแยกเซลล์แมลงออกที่ 5,000 rpm นาน 10 นาที จากนั้นทำการนำตัวอย่างโปรตีนไปแยกบน SDS/PAGE และ transfer โปรตีนลงบน nitrocellulose membrane ทำการบ่มเมมเบรนใน 5%skim milk ในสารละลาย PBST 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างเมมเบรน 3 ครั้ง ด้วย PBST นาน 10 นาทีต่อครั้ง แล้วนำเมมเบรนมาบ่มใน primary antibody (mouse anti-HA monoclonal antibody (H511C9)) ที่เจือจางใน PBST 1: 5000 นาน 1 ชั่วโมง ล้างเมมเบรน 3 ครั้ง ด้วย PBST แล้วบ่มต่อใน secondary antibody (Goat anti-mouse IgG Alkaline phosphatase conjugate) ที่เจือจาง 1:5,000 นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเมมเบรนและเติม AP conjugate substrate เพื่อการสร้างสีให้กับแถบโปรตีนที่จำเพาะ สำหรับ Dot Blot Analysis ทำเช่นเดียวกับ Western blot ยกเว้นไม่ต้องแยกโปรตีนด้วย SDS/PAGE และไม่ต้อง blot ลงเมมเบรน แต่ทำการหยดตัวอย่างที่จะทำการทดสอบบนเมมเบรนโดยตรง

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

3.1 Hemagglutinin Gene (HA gene)

ยีน HA สำหรับใช้ผลิต recombinant HA protein ในโครงการวิจัยนี้ เป็นยีนที่ได้รับการโคลน โดยคณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล จากไวรัสที่แยกได้จากคนไข้ติดเชื้อไวรัส H5N1 ประเทศไทย โดยชิ้นส่วน DNA อยู่ในพลาสมิด pGEM-T-easy โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในรูปที่ 3.1

3.2 การโคลนยีน HA เข้าสู่ Baculovirus Transfer Vector (pFastBacHT b)

ทำการเตรียม DNA ของยีน HA ด้วยการใช้วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยการออกแบบ primer ให้จำเพาะกับยีน HA และให้มี บริเวณตัดของเอนไซม์ บริเวณ 5' ของ primer ทั้ง 2 ข้างเพื่อการย้ายเข้าสู่ pFastBacHT b

ผลที่ได้จากการทำ PCR คือ ชิ้น DNA ขนาดประมาณ 1.7 kb (1,729 bp) ที่เห็นจากการตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis (รูปที่ 3.2) จากนั้นทำให้ PCR product บริสุทธิ์ โดยใช้ QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) นำชิ้นยีน HA ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* และ *BamHI* ตามด้วยการสกัดด้วย phenol/choloform extraction และตกตะกอน DNA เพื่อแยกออกจากสารละลายเพื่อนำไปเชื่อม (ligate) เข้าสู่ พลาสมิด pFastBacHTb

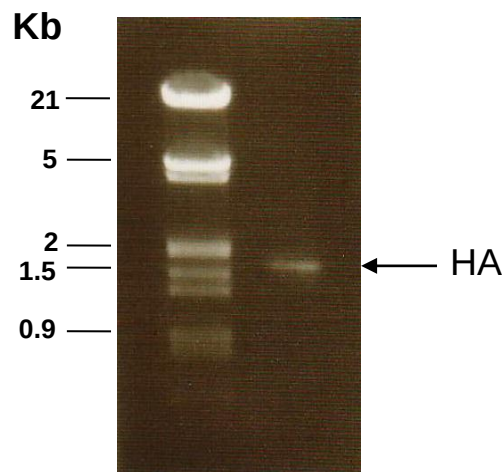
Clone\Sequence\A\Thailand\1(KAN-1)\2004(H5N1)\HA\gene

GenBank Access no. AY555150

```

      M E K I V L L F A I V S L V K S D Q I C I G Y H A N N S T E
1  TCAATCTGTC AATGAGAAA ATAGTGCCTC TTTTGGCAAT AGTCAGTCTT GTTAAAAGTG ATCAGATTGG CATTGGTTAC CATGCAAAAC ACTCGACAGA
   AGTAGACAGT TTACCTCTTT TATCAGGAAG AAAAACGTTA TCAGTCAGAA CAATTTTCAC TAGTCTAAAC GTAACCAATG GTACGTTTGT TGAGCTGTCT
101 Q V D T I M E K N V T V T H A Q D I L E K T H N G K L C D L D G V
   GCAGGTTGAC ACAATAATGG AAAAGAACGT TACTGTTACA CATGCCCAAG ACATACTGGA AAAGACACAC AACGGGAAGC TCTGCGATCT AGATGGAGTG
   CGTCCAACTG TGTATTACCT TTTTCTTGCA ATGACAATGT GTACGGGTTC TGTATGACCT TTTCTGTGTG TTGCCCTTCG AGACGCTAGA TCTACCTCAC
   K P L I L R D C S V A G W L L G N P M C D E F I N V P E W S Y I V E
201 AAGCCTCTAA TTTTGAGAGA TTGTAGTGTA GCTGGATGGC TCCTCGGAAA CCCAATGTGT GACGAATTCA TCAATGTGCC GGAATGGTCC TACATAGTGG
   TTCGGAGATT AAACCTCTCT AACATCACAT GCACCTACCG AGGAGCGGAAA GGGTTACACA CTGCTTAAGT AGTTACACGG CCTTACCAGG ATGTATCAC
   K A N P L V N D L C Y P G D F N D Y E E L K H L L S R I N H F E K I
301 AGAAGGCCAA TCCAGTCAAT GACCTCTGTT ACCCAGGGGA TTTCAATGAC TATGAAGAAT TGAACACCTT ATTGAGCAGA ATAAACCAT TTAGAGAAAT
   TCTTCCGGTT AGGTCAGTTA CTGGAGACAA TGGGTCCCTC AAAGTTACTG ATACTTCTTA ACTTTGTGGA TAACCTGCTC TATTGTGTAA AACTCTTTTA
   Q I I P K S S W S S H E A S L G V S S A C P Y Q R K S S F F R N V
401 TCAGATCATC CCCAAAAGTT CTTGGTCCAG TCATGAAGCC TCATTAGGGG TGAGCTCAGC ATGTCCATAC CAGAGAAAGT CCTCCTTTT CAGAAATGTG
   AGCTAGTAGG GGGTTTCAA GAACCAAGTC AGTACTCGG AGTAATCCCC ACTCGAGTCG TACAGGTATG GTCCTTTCA GGAGGAAAAA GTCTTTACAC
   V W L I K K N S T Y P T I K R S Y N N T N Q E D L L V L W G I H H P
501 GTATGGCTTA TCAAAAAGAA CAGTACATAC CCAACAATAA AGAGGAGCTA CAATAATACC AACCAAGAAG ATCTTTTGGT ACTGTGGGGG ATTCACCATC
   CATACCGAAT AGTTTTCTT GTCATGTATG GGTGTGTTAT TCTCCTCGAT GTTATTATGG TTGGTCTTTC TAGAAAACCA TGACACCCCC TAAGTGGTAG
   N D A A E Q T K L Y Q N P T T Y I S V G T S T L N Q R L V P R I A
601 CTAATGATGC GGCAGAGCAG ACAAAAGCTCT ATCAAAACCC AACCACTTAT ATTTCCGTTG GGACATCAAC ACTAAACCAG AGATTGGTAC CAAGAATAGC
   GATTACTACG CCGTCTCGTC TGTTTCGAGA TAGTTTTGGG TTGGTGGATA TAAAGGCAAC CCGTAGTTTG TGATTTGGTC TCTAACCATG GTTCTTATCG
   T R S K V N G Q S G R M E F K P W T I L K P N D A L N F E S N G N F
701 TACTAGATCC AAGTAAACCG GCGAAAGTGG AAGGATGGAG TTTCTCTGGA CAATTTTAA ACCGAATGAT GCAATCAACT TCGAGATGAA TCGAAATTTT
   ATGATCAGG TTTCAATTGC CCGTTTCACC TTCTACCTC AAGAAGACCT GTTAAATTTT TGGCTTACTA CGTTAGTTGA AGCTCTCATT ACCTTTAAAG
   I A P E Y A Y K I V K K G D S T I M K S E L E Y G N C N T K C Q T P
801 ATTGCTCCAG AATATGCATA CAAAATTGTC AAGAAAGGGG ACTCAACAAT TATGAAAAGT GAATTTGGAAT ATGTGTAAGT CAACACCAAG TGTCAAACCT
   TAACAGAGTC TTATACGTAT GTTTTAAACG TCTTTTCCCC TGAGTTGTTA ATACTTTTCA CTTAACCTTA TACCATTGAC GTTGTGGTTC ACAGTTTGGAG
   M G A I N S S M P F H N I H P L T I G E C P K Y V K S N R L V L A
901 CAATGGGGGG GATAAAGTCT AGTATGCCAT TCCACAATAT ACACCCTCTC ACCATCGGGG AATGCCCAAA ATATGTGAAA TCAAAACAGT TAGTCTCTGC
   GTTACCCCGC CTATTGAGA TCATACGGTA AGGTGTTATA TGTGGGAGAG TGTAGCCCCC TTACGGGGTT TATACACTTT AGTTTGTCTA ATCAGGAACG
   T G L R R N S P Q R E R R R K K R G L F G A I A G F I E G G W Q G M
1001 GACTGGGCTC AGAAATAGCC CTCAAGAGAG GAGAAGAAGA AAAAGAGAG GATTATTGG AGCTATAGCA GGTTTTATAG AGGGAGGATG GCAGGGAATG
   CTGACCCGAG TCTTTATCGG GAGTTTCTCT CTCTTCTCTC TTTTCTCTC CTAATAAACCC TCGATATCGT CCAAAATATC TCCTCTCATC TCCCTCTTAC
   V D G W Y G Y H H S N E Q G S G Y A A D K E S T Q K A I D G V T N K
1101 GTAGATGGTT GGTATGGGTA CCACCATAGC AATGAGCAGG GGATGGGGTA CGCTGCAGAC AAAGAATCCA CTCAAAAGGC AATAGATGGA TGCACCAATA
   CATCTACCAA CCATACCAT GGTGGTATCG TTACTCGTCC CCTCACCCAT GCGACGCTCG TTTCTTAGGT GAGTTTCCG TTATCTACCT CAGTGGTTAT
   V N S I I D K M N T Q F E A V G R E F N N L E R R I E N L N K K M
1201 AGGTCAACTC GATCATTGAC AAAATGAACA CTCAGTTTGA GGCCGTGGGA AGGGAATTTA ACAACTTAGA AAGGAGAATA GAGAAATTTA ACAAGAAGT
   TCCAGTTGAG CTAGTAACCTG TTTTACTTGT GAGTCAAACT CCGGCAACCT TCCCTTAAAT TGTGTAATCT TTCCTCTTAT CTCTTAAAT TGTCTTCTA
   E D G F L D V W T Y N A E L L V L M E N E R T L D F H D S N V K N
1301 GGAAGACGGG TCTCTAGATG TCTGGACTTA TAATGCTGAA CTCTCGGTTT TCATGGAAAA TGAGAGAACT CTAGACTTTC ATGACTCAAA TGTCAAGAAC
   CCTTCTGCCC AAGGATCTAC AGACCTGAAT ATTAGCACTT GAGGACCAAG AGTACCTTTT ACTCTCTTGA GATCTGAAAG TACTGTAGTT ACAGTTCTTG
   L Y D K V R L Q L R D N A K E L S N G C F E F Y H K C D N E C M E S
1401 CTTTACGACA AGGTCCGACT ACAGCTTAGG GATAATGCAA AGGAAGCTGG TACCGTTGT TTCGAGTTCT ATCATAAATG TGAATAATGA TGTATGGAAA
   GAAATGCTGT TCCAGGCTGA TGTCGAATCC CTATTACGTT TCCATGACC ATTGCCAACA AAGCTCAGA TAGTATTTAC ACTATTACTT ACATACCTTT
   V R N G T Y D Y P Q Y S E A R L K R E E I S G V K L E S I G I Y
1501 GTGTAGAGAA CGGAACGTAT GACTACCCGC AGTATTCAGA AGAAGCAAGA CTAAGAAAGG AGGAAATAGG TGGAGTAAAA TTGGAATCAA TAGGAATTTA
   CACATCTCTT GCTCTGCATA CTGATGGGCG TCATAAGTCT TCTTCGTTCT GATTTTCTCT TCCTTTATTC ACCTCATTTT AACCTCTATT ATCCTTAAT
   Q I L S I Y S T V A S S L A L A I M V A G L S L W M C S N G S L Q
1601 CCAATACTGT TCAATTTATT CTACAGTGGC GAGTTCCTCA GCATGGGCAT TCATGGTAGC TGGTCTATCC TTATGGATGT GCTCCAATGG GCTGTTACAA
   GGTTTATGAC AGTTAAATAA GATGTCACCG CTCAAGGGAT CGTGACCGTT AGTACCATCG ACCAGATAGG AATACCTACA CGAGGTTACC CAGCAATGTT
   C R I C I *
1701 TGCAGAAATT GCATTTAAAT TTGTAGTTTC AGATTG
   AGCTCTTAAA CGTAAATTTA AACACTCAAG TCTAAC
```

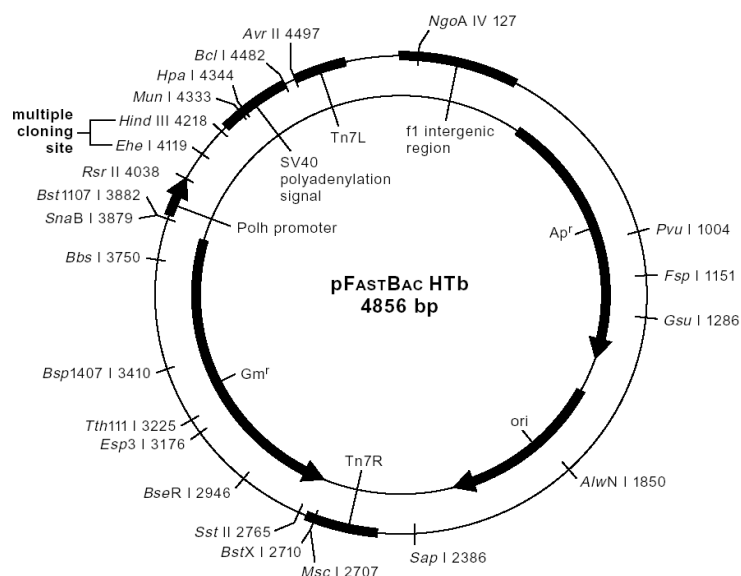
รูปที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HA ใน pGEM-T Easy cloning vector



รูปที่ 3.2 แสดงผลการทำ PCR ของยีน HA โดยใช้ pGEM-T-HA ที่มีส่วนของยีน HA เป็นต้นแบบ

3.3 Recombinant pFASTBacHTb

pFASTBacHTb plasmid (บริษัท Invitrogen, U.S.A.) (รูปที่ 3.3) เป็น plasmid ที่มียีนต้านยา ampicillin และ gentamycin และมี 6Xhis, MCS, SV40 poly(A) โดยมี polyhedrin promoter ที่เป็น strong promoter ของ AcMNPV อยู่บริเวณ upstream ของบริเวณ multi-cloning site ซึ่งเป็นบริเวณโคลนนิ่งที่ต้องการผลิตโปรตีน ในระบบ Baculovirus Expression System (AcMNPV bacmid)

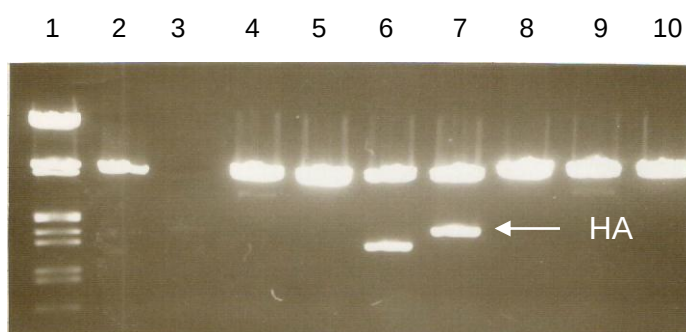


รูปที่ 3.3 แผนที่พลาสมิด pFastBacHT b (บริษัท Invitrogen, U.S.A.)

ในงานวิจัยนี้ใช้ pFASTBacHTb plasmid เป็น donor plasmid ในการส่งถ่ายยีน HA เข้าสู่ AcMNPV bacmid ด้วยวิธี transformation ของ pFASTBacHTb plasmid เข้าสู่ competent *E. coli*

DH10Bac cells ซึ่งมี AcMNPV bacmid อยู่ และจะเกิดการ transposition โดยอาศัยความช่วยเหลือของ helper plasmid (อยู่ใน *E. coli* DH10Bac cells) ที่มีการ expression ของเอนไซม์ transposase ในการส่งยีนที่อยู่ข้างในบริเวณ mini-attTn7 (มียีน HA อยู่) ของ pFASTBacHTb plasmid เข้าสู่บริเวณ mini-attTn7 ของ *lacZ* gene ที่อยู่ใน AcMNPV bacmid

ทำการย่อย pFastBacHT b ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และ *Hind*III เช่นเดียวกับชิ้นยีน HA ที่เตรียมจาก PCR และถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทั้งสองนี้แล้ว ทำการเชื่อมต่อทั้งสองส่วนเข้าด้วยกันด้วยเอนไซม์ T4 ligase และ transform เข้าสู่ *E. coli* DH5 α และคัดเลือก transformant ที่มี พลาสมิดด้วยยาปฏิชีวนะ ampicillin ทำการตรวจหา transformant ที่มี recombinant pFastBacHT b ที่เชื่อมกับ HA โดยการสกัดพลาสมิดจากโคลนีที่เลือกแล้วตรวจสอบด้วยการย่อยด้วย *Bam*HI/*Hind*III จากการตรวจสอบพลาสมิดที่ได้จาก 10 โคลนี พบว่ามี 1 ตัวอย่างที่มีส่วนของ DNA ที่ถูกตัดแยกออกจาก pFastBacHT b ที่ขนาดเท่ากับชิ้นยีน HA ที่ต่อด้วยเอนไซม์ ดังแสดงในรูป 3.4 จากนั้นจะนำ recombinant pFastBacHT b-HA ไป transform เข้าสู่ *E. coli* ที่มี Bacmid เพื่อย้ายยีน HA จากพลาสมิดนี้ไปยัง Bacmid ต่อไป



รูปที่ 3.4 Recombinant pFastBacHT b ที่มียีน HA เชื่อมเข้าเป็นส่วนหนึ่ง ณ ตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI/*Hind*III จากแถวที่ 7 ภายหลังตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ทั้งสองพบชิ้นส่วน DNA ที่มีขนาดเท่ากับชิ้น HA DNA ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด

แถวที่ 1 λ DNA marker

แถวที่ 2 pFastBacHT b ตัดด้วย *Bam*HI/*Hind*III

แถวที่ 3 HA fragment ตัดด้วย *Bam*HI/*Hind*III ก่อน ligation

แถวที่ 4-10 พลาสมิดสกัดจาก transformant ตัดด้วย *Bam*HI/*Hind*III

3.4 การทำพันธุวิศวกรรมแบคทีเรียไวรัส (Recombinant baculovirus)

การทำพันธุวิศวกรรมให้แบคทีเรียไวรัสมีการแสดงออกของยีน HA ของ H5N1 influenza virus สายพันธุ์ influenza A/Thailand/1(Kan1)/2004 โดยใช้ระบบ Bac-to-Bac system (รูปที่ 3.3) ภายหลังกระบวนการ transformation ของ donor plasmid ที่มียีนที่ต้องการอยู่เข้าสู่ competent *E. coli* DH10Bac cells นั้นจะเกิดการส่งถ่าย mini Tn7 จาก เข้าไปสู่ mini att Tn7 ทั้งสองข้างบน bacmid ใน competent *E. coli* DH10Bac cells ได้อย่างง่ายและมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะไปขัดขวางการแสดงออกของ *lacZ* gene

เมื่อนำ *E. coli* DH10Bac cells ที่ผ่านการทำ transformation แล้วไปเลี้ยงบน LB agar plate ที่มียา gentamicin, kanamycin, tetracycline X-gal และ IPTG จะทำให้ได้โคโลนีสีขาวที่มีการนำยีนที่ต้องการเข้าสู่ bacmid แล้ว หลังจากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่มีคุณสมบัติตามต้องการแล้วจึงนำโคโลนีของ *E. coli* DH10Bac cells นี้ไปเลี้ยงต่อเพื่อเพิ่มจำนวน recombinant bacmid และนำไปทำการ transfection เข้าสู่เซลล์แมลงเพื่อให้ได้ recombinant baculovirus ที่สมบูรณ์ เพื่อที่จะได้นำไป infect เข้าสู่เซลล์แมลงเพื่อผลิตโปรตีน คือ Recombinant HA protein ที่ต้องการ

3.5 การตรวจสอบ Recombinant HA bacmid และ Recombinant HA baculovirus

สามารถตรวจสอบว่า bacmid มียีน HA เป็นส่วนหนึ่งในจีโนมหรือไม่ นำ DNA ที่สกัดได้จากแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีขาว มาตรวจสอบโดยเทคนิค PCR โดยใช้ primers 2 คู่ ดังนี้

1. Primers: H5HAf และ H5HAr สำหรับตรวจสอบว่ามี HA gene อยู่บนจีโนมของ recombinant HA bacmid (primers ทั้งสองจำเพาะกับ HA gene)

H5HAf: 5'- CG GGA TCC ATG GAG AAA ATA GTG CTT CTT TTT GC – 3'

H5HAr: 5'- TA AAG CTT TTA AAT GCA AAT TCT GCA TTG TAA CG -3'

ผลิตภัณฑ์ PCR จากการใช้ primer คู่นี้มีขนาด 1,729 bp

2. Primers: M13f และ M13r สำหรับตรวจสอบตำแหน่งของ HA gene ที่แทรกอยู่บนจีโนมของ recombinant HA bacmid ณ ตำแหน่งตรงกลางยีน Lac Z (primers ทั้งสองจำเพาะกับ LacZ gene)

M13f: 5'- GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'

M13r: 5'- AAC AGC TAT GAC CAT G-3'

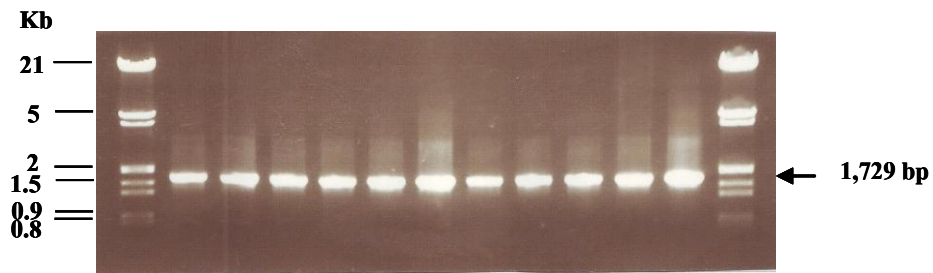
ในการตรวจสอบการแทรกของยีน HA ณ ตำแหน่งตรงกลางยีน lacZ ได้ทำการสลับ primer คู่ที่ 2 ใช้ร่วมกับคู่ที่ 1 ด้านบนดังนี้

ก. ใช้ M13f และ H5HAr จะได้ ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด $128+1,552+1,729 = 3,379$ bp

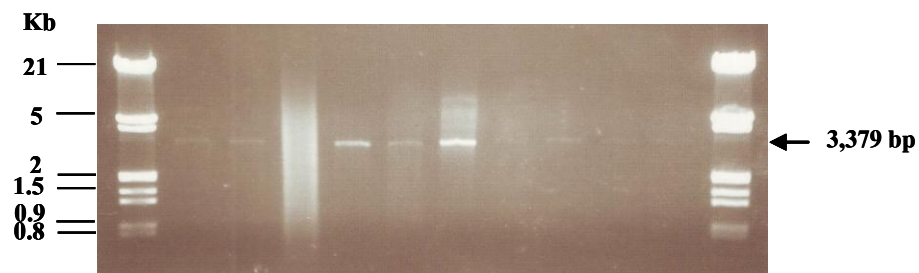
ข. ใช้ M13r และ H5HAf จะได้ ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด $145+458+1,729 = 2,332$ bp

จากการสกัดดีเอ็นเอของ Bacmid จากโคโลนีสีขาวจำนวน 10 โคโลนี แล้วนำมาทำ PCR ด้วย primer ด้านบน ผลการทดสอบดังแสดงในรูปที่ 8 โดยเมื่อใช้ primer คู่ H5HAf และ H5HAr คู่ M13f และ H5HAr และคู่ M13r และ H5HAf พบว่าดีเอ็นเอของ Bacmid ทั้ง 10 ตัวอย่าง ให้ผลิตภัณฑ์ PCR ตามขนาดที่กำหนดจากบริเวณเกาะของ Primer แสดงว่าทั้ง 10 โคโลนีสีขาวที่คัดเลือก เป็น recombinant HA Bacmid ที่มียีน HA เป็นส่วนหนึ่งของจีโนม

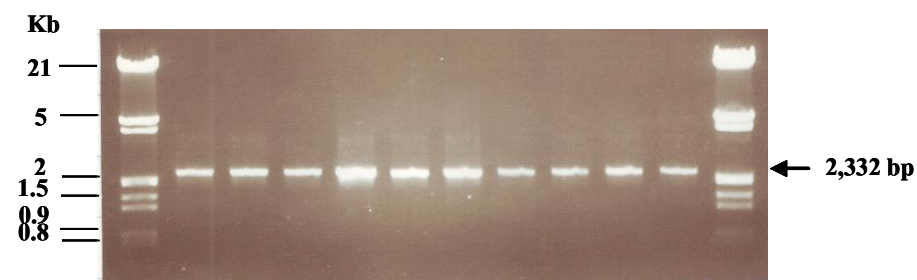
A)



B)

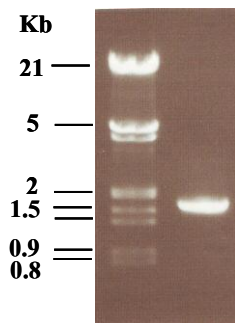


C)



รูปที่ 3.5 แสดงการตรวจสอบการแทรกของยีน HA เป็นส่วนหนึ่งของ Bacmid โดยใช้ primer คือ คู่ H5HAf และ คู่ H5HAr (A) M13f และ H5HAr (B) และ คู่ M13r และ H5HAf (C)

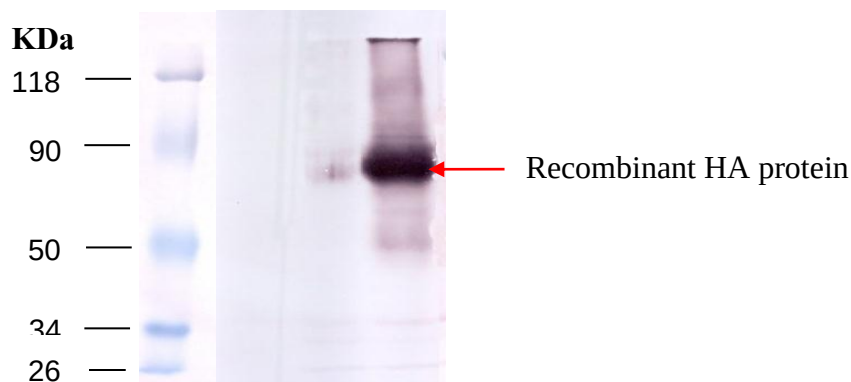
หลังจากการตรวจสอบด้วย PCR แล้วได้นำ recombinant HA bacmid ที่สกัดได้จาก 1 โคโลนี มาทำการ transfect เข้าสู่เซลล์แมลง SF-9 โดยใช้ transfectin หลังจากนั้น 72 ชั่วโมงทำการเก็บเกี่ยวอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งมี recombinant HA baculovirus ซึ่ง budding ออกจากเซลล์แมลง เก็บเป็น virus stock จากนั้นนำไวรัสที่ได้ไปใช้ infect เข้าสู่เซลล์แมลง และเมื่อนำเซลล์แมลงที่ถูก infect มาสกัดดีเอ็นเอมาทำ PCR เพื่อตรวจสอบว่าดีเอ็นเอของไวรัสที่ได้หลังการทำ transfection มียีน HA อยู่ในจีโนมหรือไม่ โดย primer ที่ใช้ คือ primer ที่จำเพาะกับยีน HA (H5HAf และ H5HAr) ผลการตรวจสอบแสดงในรูปที่ 3.6



รูปที่ 3.6 การตรวจสอบยีน HA ซึ่งแทรกอยู่ในจีโนมของ recombinant HA baculovirus ที่เตรียมได้จากเซลล์แมลงที่ถูก transfect ด้วย recombinant HA bacmid โดยใช้ primer จำเพาะกับยีน HA (H5HAf และ H5HAr)

3.6 การผลิต Recombinant HA protein

จากผลการตรวจสอบด้วย PCR พบว่าแบคทีเรียไวรัสที่ได้เป็น recombinant HA baculovirus ที่มียีน HA เป็นส่วนหนึ่งของจีโนม จากการที่สามารถสร้างผลิตภัณฑ์ PCR จากต้นแบบที่เป็นดีเอ็นเอของ recombinant HA baculovirus ได้ตามขนาดยีน HA จากนั้นทำการตรวจสอบว่ายีน HA มีการแสดงออก โดยมีการสร้าง recombinant HA protein จากเซลล์แมลงที่ถูก infect ด้วย recombinant HA baculovirus หรือไม่ โดยการนำเซลล์แมลงที่ถูก infect แล้วนำมาทำให้แตกโดยการละลายเซลล์ใน lysis buffer จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาทำการตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธีการ Western Blot analysis ซึ่งใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับ influenza HA protein ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล ผลการตรวจสอบดังแสดงในรูปที่ 3.7 ซึ่งพบว่าเซลล์แมลงมีการผลิตโปรตีนที่จับจำเพาะกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 65 kDa ซึ่งเป็นขนาดเดียวกับที่เคยมีการรายงานขนาดของ recombinant HA protein โดย Shen และคณะ⁽¹⁾ แต่ไม่พบในเซลล์แมลงที่ไม่ถูก infect (negative control) แสดงว่าเซลล์แมลงที่ถูก infect ด้วย recombinant HA baculovirus สามารถผลิต recombinant HA protein ได้



รูปที่ 3.7 Western Blot Analysis เพื่อตรวจสอบการสังเคราะห์ recombinant HA protein จากเซลล์แมลงที่ถูก infect ด้วย recombinant HA baculovirus ลูกศรแสดงแถบโปรตีนที่ถูกจับอย่างจำเพาะกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน HA (แถวที่ 1: โปรตีนมาตรฐาน 2: เซลล์แมลงที่ไม่ถูก infect (negative control) 3 และ 4: เซลล์ที่ถูก infect ด้วย recombinant baculovirus วันที่ 3 และ 4 ตามลำดับ)

3.7 การสกัด recombinant HA protein

การเตรียมตัวอย่างโปรตีน

นำเซลล์ที่ได้จากถังหมักน้ำหนักเปียกประมาณ 2.42 กรัม และเซลล์มาใส่ที่ได้จากขวดแบบเขย่าน้ำหนักเปียกประมาณ 1.78 กรัม รวมน้ำหนักเซลล์เปียกทั้งหมด เท่ากับ 4.20 กรัม เติม extraction buffer (1 % Tergitol NP-9 ใน บัฟเฟอร์ A) pH 5.3 ปริมาตร 147.50 ml ลงไปหมุนคนของผสมด้วย magnetic stirrer นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 g นาน 25 นาที และกรองตะกอนเซลล์ที่เหลืออยู่ผ่านแผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.45 μm ก่อนแล้วจึงนำเฉพาะส่วนใสมาแยกโปรตีน

การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์

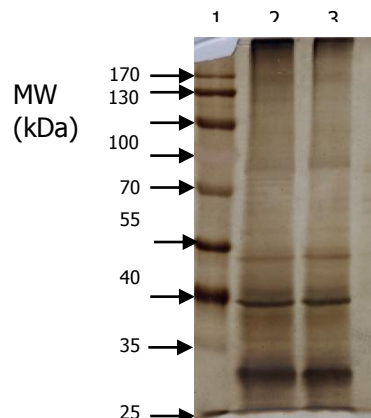
1.การกำจัด DNA ปนเปื้อนด้วย Anion Exchange Chromatography

นำสารละลายใสของโปรตีนใน extraction buffer ปริมาตร 145 ml มาผ่านลงในคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุลบ QXL ต่อกับ QFF (GE healthcare) ขนาด 1 ml เพื่อทำการกำจัด DNA ปนเปื้อนที่จะรบกวนกระบวนการสกัด โดยทำให้เรซินภายในอัมตด้วยบัฟเฟอร์ A pH 5.89 อยู่ก่อนแล้ว ด้วยอัตราการไหล 2 ml/min เก็บส่วนที่ผ่านคอลัมน์ (QXL/QFF flowthrough) ออกมาเพื่อนำไปแยกโปรตีนต่อ และเก็บบางส่วนเพื่อไปวิเคราะห์ ด้วย 10% gel SDS PAGE ย้อมแผ่นเจลที่ได้ด้วย silver ดังรูปที่ 3.8

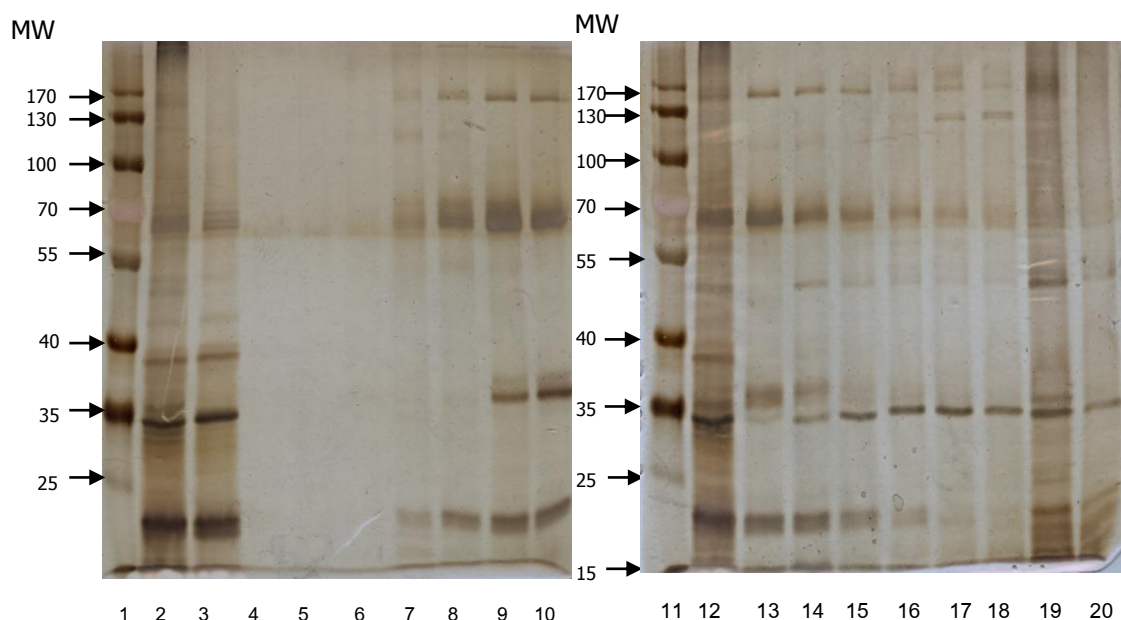
2.การสกัดแยก Recombinant HA protein ด้วย Cation Exchange Chromatography

นำ fraction ส่วน QXL/QFF flowthrough จากคอลัมน์ QXL/QFF (SPFF sample) ไปผ่านคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุบวก SPFF (GE healthcare) เพื่อสกัดแยกเฉพาะ recombinant HA protein

โดยคอลัมน์มีขนาด 8 ml ใช้อัตราการไหล 2 ml/min ซึ่งทำให้เรซินภายในอิมมัตว์ด้วยบัฟเฟอร์ A pH 5.9 อยู่ก่อนแล้ว หลังจากนั้นล้างคอลัมน์ (SPFF wash) ด้วยบัฟเฟอร์เดียวกัน แล้วชะโปรตีนที่เกาะคอลัมน์แบบ linear gradient จาก 0% ถึง 100% ด้วยบัฟเฟอร์ B pH 7.5 และบัฟเฟอร์ C ซึ่งมี pH 7.5 และ 150 mM NaCl ระหว่างนี้เก็บ fraction ส่วนที่ชะโปรตีนเป็นช่วงๆ (SPFF Elute 0%B จนถึง 100 B% และจาก 100%B จนถึง 100 %C) จากนั้นล้างโปรตีนที่เหลือเกาะคอลัมน์ออกด้วย 1 M NaCl นำ fraction ส่วนต่างๆที่ได้ไปวิเคราะห์ ด้วย 10% gel SDS PAGE ย้อมแผ่นเจลที่ได้ด้วย silver ดังรูปที่ 3.9



รูปที่ 3.8 รูปแบบโปรตีนหลังจากผ่านลงในคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุลบ QFF แถวที่ 1 คือ โปรตีน marker ที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล แถวที่ 2 คือ สารสกัดโปรตีน rHA จากเซลล์ (QXL/QFF sample) แถวที่ 3 คือ QXL/QFF flowthrough

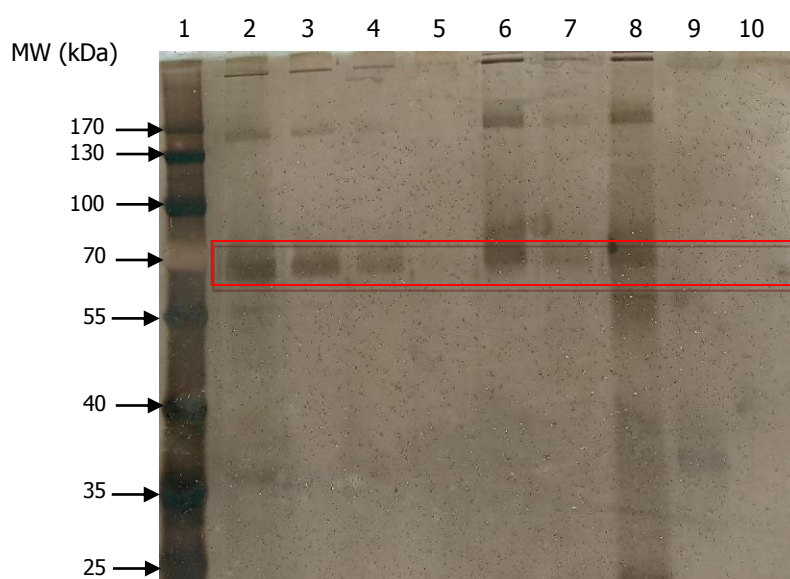


รูปที่ 3.9 ผลการผ่าน QXL/QFF flowthrough ลงในคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุบวก SPFF โดย 10% gel SDS PAGE ย้อมด้วย silver แถวที่ 1 คือ โปรตีน marker ที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล แถวที่ 2 คือ SPFF sample (QFF flowthrough) แถวที่ 3 คือ SPFF flowthrough แถวที่ 4 คือ SPFF wash แถวที่ 5 คือ

SPFF Elute 0-9%B แถวที่ 6 คือ SPFF Elute 9-13%B แถวที่ 7 คือ SPFF Elute 14-18%B แถวที่ 8 คือ SPFF Elute 18-25%B แถวที่ 9 คือ SPFF Elute 25%B แถวที่ 10 คือ SPFF Elute 25-31%B แถวที่ 11 คือ โปรตีน marker ที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล แถวที่ 12 คือ SPFF sample (QXL/QFF flowthrough) แถวที่ 13 คือ SPFF Elute 31-40%B แถวที่ 14 คือ SPFF Elute 40-55%B แถวที่ 15 คือ SPFF Elute 55-70%B แถวที่ 16 คือ SPFF Elute 70-87%B แถวที่ 17 คือ SPFF Elute 87-100%B แถวที่ 18 คือ SPFF Elute 100%B-C แถวที่ 19 และ 20 คือ SPFF Elute 100%C

3. การสกัด Recombinant HA protein ให้บริสุทธิ์ด้วย Hydroxyapatite CHT™

จากรูปที่ 3.9 พบว่า recombinant HA protein ที่เกาะกับเรซินถูกชะออกมาใน Fraction SPFF Elute 14-18%B ไปแยกโปรตีนต่อโดยนำไปผ่านคอลัมน์ hydroxyapatite CHT™ type1 Biorad (CHT sample) ขนาด 5 ml ที่อัตราการไหล 2 ml/min ซึ่งทำให้เรซินภายในอิมมัตด้วยบัฟเฟอร์ B pH 6.00 เก็บ fraction ส่วนที่ผ่านคอลัมน์ (CHT flowthrough) ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ B อย่างน้อย 5 column volume เก็บ fraction ส่วนที่ล้างคอลัมน์ (CHT wash) และชะ (elute) โปรตีนที่เกาะคอลัมน์ อยู่ด้วยบัฟเฟอร์ D 40 mM phosphate pH 7.20 ตามด้วย บัฟเฟอร์ E 100 mM phosphate pH 7.20 และ บัฟเฟอร์ F 500 mM phosphate pH 7.20 ตามลำดับ ระหว่างนี้เก็บ fraction ส่วนที่ชะโปรตีนเป็น ช่วงๆ (CHT Elute) นำ fraction ส่วนต่างๆ ที่ได้ไปวิเคราะห์ ด้วย 10%gel SDS PAGE ย้อมแผ่นเจล ที่ได้ด้วย silver ดังรูปที่ 3.10



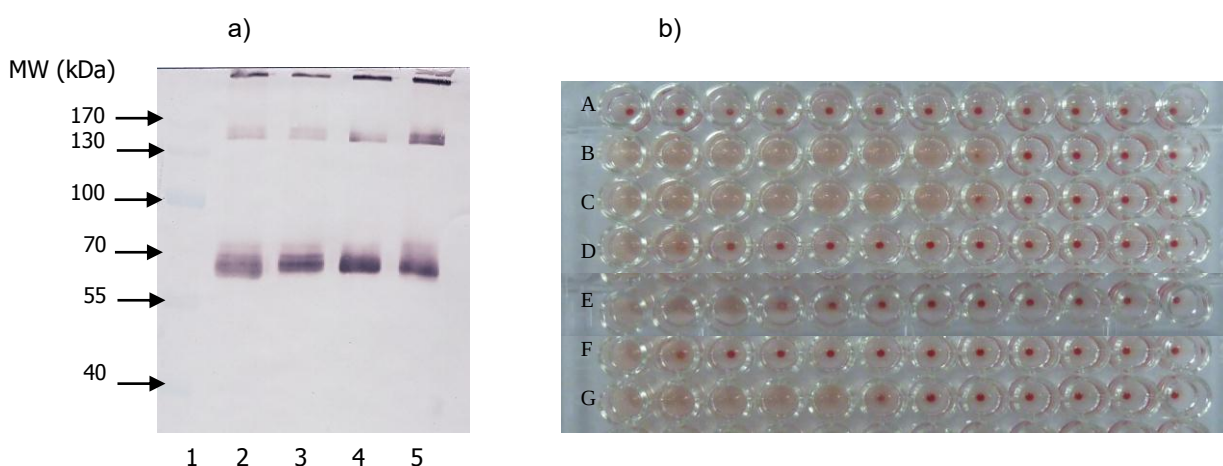
รูปที่ 3.10 รูปแบบโปรตีนหลังการผ่าน SPFF Elute 18-25%B ลงในคอลัมน์ hydroxyapatite (CHT) วิเคราะห์ด้วย 10% gel SDS PAGE ย้อม silver stain แถวที่ 1 คือ โปรตีน marker ที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล แถวที่ 2 คือ CHT sample (SPFF Elute 18-25%B) แถวที่ 3 คือ CHT flowthrough แถวที่ 4 คือ CHT wash แถวที่ 5 คือ CHT Elute buffer D 40 mM phosphate fraction1 แถวที่ 6 คือ CHT Elute buffer D 40 mM phosphate fraction 1 ทำให้เข้มข้นด้วย centrifugal concentrator

molecular weight cut off 50 kDa แลวที่ 7 คือ CHT Elute buffer D 40 mM phosphate fraction 2 แลวที่ 8 คือ CHT Elute buffer D 40 mM phosphate fraction 2 ทำให้เข้มข้นด้วย centrifugal concentrator molecular weight cut off 50 kDa แลวที่ 9 คือ CHT Elute buffer E 100 mM phosphate แลวที่ 10 คือ CHT Elute buffer F 500 mM phosphate

จากรูปที่ 3.11 จะเห็นได้ว่หลังจากการสกัดโปรตีนด้วย CHT column จะพบว่าโปรตีนปนเปื้อนจะเกาะติดกับเรซิน ส่วน elute และ wash จะมีเฉพาะส่วนของ Recombinant HA protein เป็นหลัก และมีแถบโปรตีนที่มี molecular weight สูงกว่าที่คาดว่าจะเป็น aggregate form ของ recombinant HA protein โดยสรุปแล้วการสกัด recombinant HA protein ให้บริสุทธิ์มีขั้นตอนประกอบด้วย

1. นำ cell lysate เฉพาะส่วนไซโตพลาสซึมผ่านการกำจัด DNA ปนเปื้อนด้วย Anion Exchange chromatography (QXL/QFF) นำส่วน flow through มาสกัดต่อ
2. นำ flow through จาก 1. มาผ่าน Cation Exchange Chromatography (SPFF) เพื่อแยกเฉพาะ recombinant HA protein โดยโปรตีนนี้จะเกาะกับ SP Sepharose ที่ถูกชะออกเมื่อใช้ NaCl ในช่วง 18-25% buffer B อย่างไรก็ตามส่วนนี้ยังมีโปรตีนอื่นปะปนอยู่
3. นำส่วนชะจาก SPFF column ตามข้อ 3 มาทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วย Hydroxyapatite column (CHT) โดยโปรตีนปนเปื้อนจะเกาะกับเรซิน ส่วน Recombinant HA protein จะผ่านคอลัมน์นี้ในส่วน flow through และ wash ซึ่งสามารถนำไปเพิ่มความเข้มข้นต่อ

จากการดำเนินการเพื่อสกัด Recombinant HA protein ดังกล่าวข้างต้น ทุกขั้นตอนจะตรวจพบ Recombinant HA protein ดังจะเห็นได้จากผลการตรวจสอบด้วย Western blot analysis ดังรูปที่ 3.11 (a) นอกจากนี้ยังพบว่า Recombinant HA protein ในตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการสกัดทุกขั้นตอนยังมีกิจกรรมคือ haemagglutination ตามคุณสมบัติของ Hemagglutinin protein ตามธรรมชาติ รูปที่ 3.11(b)



รูปที่ 3.11 การตรวจสอบ Recombinant HA protein ในขั้นตอนการสกัดแยกโปรตีนในขั้นตอนต่างๆ (a) วิเคราะห์ด้วย Western blot analysis ใช้ 10% gel SDS PAGE แลวที่ 1 คือ โปรตีน marker ที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล แลวที่ 2 คือ QXL/QFF sample แลวที่ 3 คือ QXL/QFF flowthrough (SPFF sample) แลวที่ 4 คือ SPFF elute 18-25%B pH 6.27(CHT sample) แลวที่ 5 คือ CHT

flowthrough pH 6.2 ทำให้เข้มข้นด้วย centrifugal concentrator molecular weight cut off 50 kDa
(b) การนำส่วนต่างๆ ที่ได้จากการแยกโปรตีนมาทำ Haemagglutination assay แถว A คือ PBS negative control แถว B คือ QXL/QFF sample แถว C คือ QXL/QFF flowthrough (SPFF sample) แถว D คือ SPFF elute 14-18 %B pH 6.17(CHT sample) แถว E คือ SPFF elute 18-25%B pH 6.27(CHT sample) แถว F คือ CHT elute buffer D 40 mM phosphate fraction ที่ 1 แถว G คือ CHT elute buffer D 40 mM phosphate fraction ที่ 1 ทำให้เข้มข้นด้วย centrifugal concentrator molecular weight cut off 30 kDa

บทที่ 4

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

4.1 สรุปผลการทดลอง

1. สามารถทำพันธุวิศวกรรมแบคทีเรียไวรัสให้มียีน HA เข้าไปในจีโนมในรูปแบบ bacmid และทำให้ยีนนี้มีการแสดงออกเมื่อนำแบคทีเรียไวรัส หรือ recombinant bacmid นี้ไป infect เข้าสู่เซลล์แมลงที่เป็น host ของแบคทีเรียไวรัส
2. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน HA โดยใช้เทคนิค Western blot analysis โดยใช้ monoclonal antibody ที่จำเพาะกับ HA protein พบว่ามีแถบโปรตีนที่จำเพาะกับแอนติบอดี แสดงว่ามีการผลิต recombinant hemagglutinin protein
3. สามารถทำการสกัด recombinant HA protein ให้บริสุทธิ์โดยวิธี Chromatography ตามลำดับคือ Anion exchange chromatography (QXL/QFF) ต่อด้วย Cation Exchange chromatography (SPFF) และ Hydroxyapatite Chromatography (CHT) โดยในทุกขั้นตอนไม่มีผลกระทบต่อ hemagglutination activity ของ Recombinant HA protein

4.2 ข้อเสนอแนะ

ควรทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต Recombinant HA protein โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบ เช่น เซลล์แมลง (ระยะการเจริญ ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น ฯลฯ) recombinant baculovirus (ปริมาณไวรัสต่อจำนวนเซลล์) ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวผลผลิตโปรตีน เป็นต้น เนื่องจากการใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ให้ผลผลิตสูงสุด จะมีผลต่อความสำเร็จในการขยายขนาดการผลิตโปรตีนเพื่อการทดสอบการเป็นวัคซีนที่ดีต่อไป

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

- 1) Hoffmann, E., Neumann, G., Kawaoka, Y., Hobom G. and Webster, R.G. (2000) A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97, 6108-6113.
- 2) Neumann, G., Watanabe, T., Ito, H., Watanabe, S., Goto, H., Gao, P., Hughes, M., Perez, D.R., Hoffmann, E., Hobom, G. and Kawaoka, Y. (1999) Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96, 9345-9350.
- 3) <http://www.cdc.gov/flu/avian/gen-info/pandemics.html>
- 4) Fields Virology, 4th ed, Knipe & Howley eds, Lippincott, Williams & Wilkins, 2001, Fig. 47-2.
- 5) Medical Microbiology (2002) 4th ed., Murray, Rosenthal, Kobayashi & Pfaller, Mosby Inc.,
- 6) Lamb, R.A., and Krug, R.M.(1996) *Orthomyxoviridae*: The viruses and their replication. *In* "Fields virology" (B.N. Fields, D.M. Knipe and P.M. Howley, Eds), pp. 1353-1395, Lippincott-Raven, Philadelphia.
- 7) <http://www.proteinsciences.com/vaccines.htm>
- 8) Galarza JM., Latham T. and Cupo A. (2005) Virus-like particle vaccine conferred complete protection against a lethal influenza virus challenge. *Viral Immunol.*, 18(2): 365-372.
- 9) Wang K., Holtz KM., Anderson K., Chubet R., Mahmoud W. and Cox MJ. (2006) Expression and purification of an influenza hemagglutination-one step closer to a recombinant protein-based influenza vaccine. *Vaccine*, 24, 2176-2185.
- 10) New N., Qigai H., Damrongwatanapokin S., Du Q., Manopo I., Limlamthong Y., Fenner BJ., Spencer L., and Kwang J. (2006) Expression of hemagglutinin protein from the avian influenza virus H5N1 in a baculovirus/insect cell system significantly enhanced by suspension culture. *BMC Microb.*, 6 :16.
- 11) Luckow, V.A., Lee, S.C., Barry, G.F. and Olins, P.O.(1993) Efficient generation of infection, recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *E. coli.*, *Journal of Virology*, 67, 4566-4579.