



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา	จุลชีววิทยา
สาขา	ภาควิชา
เรื่อง	การสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน E2 ของไวรัสชิคุนกุนยา เพื่อใช้พัฒนาชุดตรวจโรคชิคุนกุนยา
	Cloning and Expression of Envelope Protein E2 of Chikungunya Virus For Application of Diagnosis
นามผู้วิจัย	นายจิรัฏฐกร เขียรธนนันต์กุล
ได้พิจารณาเห็นชอบโดย	
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	(รองศาสตราจารย์ ร้อยเอกชัชววัฒน์ กิตติกุล, วท.ม.)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	(อาจารย์เจษฎา โพธิรัตน์, Ph.D.)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	(อาจารย์ปนัดดา เทพอักษร, Ph.D.)
หัวหน้าภาควิชา	(รองศาสตราจารย์ ร้อยเอกชัชววัฒน์ กิตติกุล, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่

เดือน

พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน E2 ของไวรัสชิคุนกุนยา เพื่อใช้พัฒนา
ชุดตรวจโรคชิคุนกุนยา

**Cloning and Expression of Envelope Protein E2 of Chikungunya Virus for
Application of Diagnosis**

โดย

นายจิรัฏฐกร เขียรชนันต์กุล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

พ.ศ. 2554

จิรัฐกร เขียรธนนต์กุล 2554: การสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน E2 ของไวรัสซิกนุกุนยา เพื่อใช้พัฒนาชุดตรวจโรคซิกนุกุนยา ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) สาขา วิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ ร้อยเอกชัยวัฒน์ กิตติกุล, วท.ม. 93 หน้า

โรคซิกนุกุนยาหรือโรคไข้วอดข้ออยู่กลายเป็นปัญหาทางสาธารณสุขของหลายประเทศใน แถบเอเชียและแอฟริกา เกิดจากการติดเชื้อไวรัสซิกนุกุนยาโดยมีอยู่กลายเป็นพาหะนำโรค โปรตีน E2 ของไวรัสซิกนุกุนยามีบทบาทในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกาย ดังนั้นการศึกษาวิจัย ครั้งนี้ได้ทำการผลิตโปรตีน E2 ของไวรัสซิกนุกุนยา โดยการตัดต่อยีน E2 เข้าสู่ พลาสมิด pET21a และให้ชื่อว่า pET21a-CHK-E2 พบว่าเหมือนกันถึง 99 เปอร์เซ็นต์ทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับ กรดอะมิโน เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับไวรัสซิกนุกุนยา สายพันธุ์ Ross (AF490259.2.) เมื่อนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ดังกล่าวเข้าสู่ *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน E2 โดยใช้สภาวะการเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีน ที่ อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของ IPTG ที่ 0.5 มิลลิโมลาร์ และใช้ระยะเวลาในการ เหนี่ยวนำเป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน E2 มีขนาด ประมาณ 46 กิโลดาลตันและเป็น โปรตีนที่ไม่ละลายน้ำอยู่ในรูปของ inclusion bodies การศึกษาคุณลักษณะของรีคอมบิแนนท์ โปรตีน E2 โดยทำปฏิกิริยากับตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคไข้วอดข้อและตัวอย่างซีรัมคนปกติด้วย วิธี Western blot และ Dot blot จากผลการศึกษาพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน E2 สามารถจับกับ แอนติบอดีในตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยและไม่ทำปฏิกิริยากับตัวอย่างซีรัมคนปกติ แสดงให้เห็นว่า รีคอม บิแนนท์โปรตีน E2 น่าจะนำไปใช้เป็นวัตถุคิบบในการพัฒนาชุดตรวจโรคได้ เช่น ELISA หรือ immunochromatography (IC) ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาเบื้องต้นในการนำรีคอมบิแนนท์ โปรตีน E2 ไปพัฒนาชุดตรวจโรค โดยใช้หลักการ IC ผลจากการศึกษาพบว่า รีคอมบิแนนท์ โปรตีน E2 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคไข้วอดข้อและตัวอย่าง ซีรัมคนปกติได้ แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน E2 ไปใช้เป็น วัตถุคิบบในการพัฒนาชุดตรวจโรคไข้วอดข้ออยู่

ลายมือชื่อนิติ

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Jiruthakorn Thiantanunkul 2011: Cloning and Expression of Envelope Protein E2 of Chikungunya Virus for Application of Diagnosis. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Associate Professor Captain Chaivat Kittigul, M.Sc. 93 pages.

Chikungunya is a viral disease which is a major impact on public health in many countries. Envelope protein E2 of Chikungunya virus (CHIKV) is shown to be a predominant epitope for stimulating immune responses. In this study, the amplified E2 gene of virus was cloned into an expression vector pET21a to construct the recombinant plasmid, pET21a-CHK-E2. Nucleotide and its deduced amino acid sequences of the recombinant plasmid were found to be 99% identity to those of Chikungunya virus Ross strain retrieved from GenBank AF490259.2. To produce a recombinant E2 protein, the recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS, and the transformed *E. coli* strain was induced with 0.5 mM IPTG at 20°C. After 3 hours of induction, a 46-kDa recombinant protein was detected as an inclusion body. After protein solubilization using 0.5% laurylsarcosine, the solubilized recombinant protein was characterized by western blot analysis using CHIKV infection patients' serum. The western blot result showed a specific binding of recombinant E2 protein to antibody against E2. The dot blot analysis showed recombinant protein E2 did not bind to antibody from normal serum. Both two results suggesting that the recombinant E2 protein is possibly used in serological diagnostic methods such as ELISA, immunochromatography (IC). In this study we used recombinant E2 as a raw material to pre-study for developing diagnostic test kit of Chikungunya disease as IC. The IC showed recombinant protein E2 reacted to CHIKV infection patients' serum, and recombinant protein E2 did not react to normal serum. All of results showed the potential of recombinant protein E2 for using as a raw material for developing diagnostic test kit.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ร้อยเอกชัยวัฒน์ กิตติกุล อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก อาจารย์เจษฎา โพธิ์รัตน์ และ อาจารย์ปนัดดา เทพอักษร อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ร่วม อาจารย์อิงอร กิมกง ประธานการสอบ และ รองศาสตราจารย์ ลีรา กิตติกุล ผู้ทรง
คุณวุฒิภายนอก ที่ให้คำปรึกษา แนะนำ ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จ
ลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ อาจารย์ เจ้าหน้าที่ และเพื่อนๆในภาควิชาจุลชีววิทยาที่คอยช่วยเหลือ แนะนำ
และเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ และเพื่อนๆที่ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพด้านการแพทย์และสาธารณสุข
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ที่คอยให้ความช่วยเหลือ แนะนำ และเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์
ในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอมอบคุณความดีและประโยชน์ที่พึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ แก่บิดา มารดา
ผู้มีพระคุณทุกท่าน และคณาจารย์ผู้ประสพวิชาความรู้ทุกท่านตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

จิรัฏฐกร เขียรชนันต์กุล

เมษายน 2554

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	12
ผลและวิจารณ์	21
สรุปและข้อเสนอแนะ	61
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	64
ภาคผนวก	69
ภาคผนวก ก สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	70
ภาคผนวก ข วิธีการทดลอง	79
ภาคผนวก ค โครงสร้างจีโนมของไวรัสซิกุนกุนยา สายพันธุ์ Ross และโครงสร้างจีโนมของพลาสมิด pGEM®-T Easy และ pET21a	85
ภาคผนวก ง ผลการ Blast นิวคลีโอไทด์ของยีน E2 บน pGEMT-CHK-E2 กับฐานข้อมูล NCBI และผลการ Blast กรดอะมิโนของโปรตีน E2 บน pGEMT-CHK-E2 กับฐานข้อมูล NCBI	90
ประวัติการศึกษาและทำงาน	93

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ร้อยละของอาการและอาการแสดงต่างๆที่พบในผู้ป่วยโรคไข้วัดข้อยุลงลาย	7
2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm และความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน (Total protein) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS ที่มี พลาสมิด pET21a-CHK-E2 ที่มีการเหนี่ยวนำการสร้าง rE2 protein ที่อุณหภูมิ 37 °C, 28 °C และ 20 °C และ IPTG ความเข้มข้น 1.0 mM	49
3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm และความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน (Total protein) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS ที่มี พลาสมิด pET21a-CHK-E2 ที่มีการเหนี่ยวนำการสร้าง rE2 protein ที่อุณหภูมิ 20 °C และ IPTG ความเข้มข้น 0.0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 mM	49
4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm และความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน (Total protein) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS ที่มี พลาสมิด pET21a-CHK-E2 ที่มีการเหนี่ยวนำการสร้าง rE2 protein ที่อุณหภูมิ 20 °C และ IPTG ความเข้มข้น 0.5 mM โดยเก็บตัวอย่างชั่วโมง ที่ 0, 1, 2, 3 4, และ 5	50
ตารางผนวกที่	
1 การเตรียม reaction mixture สำหรับตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	71
2 การเตรียม reaction mixture เพื่อทำ ligation	71
3 เอนไซม์ตัดจำเพาะ	72
4 การเตรียม One step RT-PCR reaction mixture	72
5 การเตรียม PCR reaction mixture	73
6 การเตรียม 15% polyacrylamide gel	75

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แสดงส่วนประกอบของชุดตรวจโรคไข้ปวดข้อยุงลายชนิด IC	19
2 แสดงแถบดีเอ็นเอจากการทำ One step RT-PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis	22
3 แสดงแถบดีเอ็นเอจากการทำ PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ใน <i>E. coli</i> สายพันธุ์ 109	25
4 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบสบนยีน <i>E2</i> ใน pGEMT-CHK-E2-1 กับ ไวรัสชิคุนกุนยาสายพันธุ์ต่างๆที่มีรายงานใน GenBank	26
5 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>E2</i> ใน pGEMT-CHK-E2-1 กับ ไวรัสชิคุนกุนยาสายพันธุ์ต่างๆที่มีรายงานใน GenBank	31
6 แสดงแถบดีเอ็นเอจากการทำ PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ใน <i>E. coli</i> สายพันธุ์ Top10F'	33
7 แสดงแถบดีเอ็นเอจากการตัดพลาสมิด pET21a-CHK-E2 ด้วยเอนไซม์ <i>XhoI</i> ด้วย 1% agarose gel electrophoresis	34
8 แสดงแถบดีเอ็นเอจากการทำ PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ใน <i>E. coli</i> สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS	35
9 แสดงแถบดีเอ็นเอจากการตัดพลาสมิด pET21a-CHK-E2 ด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i> และ <i>NotI</i> ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ใน <i>E. coli</i> สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS	36
10 แสดงแถบโปรตีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS ที่มี พลาสมิด pET21a-CHK-E2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้สร้าง rE2 protein ด้วย IPTG ความเข้มข้น 1.0 mM เปรียบเทียบกับ โปรตีนมาตรฐาน	38
11 แสดงแถบโปรตีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS ที่มี พลาสมิด pET21a-CHK-E2 โคลนที่ 1 (pET21a-CHK-E2 -1) ที่เหนี่ยวนำให้สร้าง rE2 protein ด้วย IPTG ความเข้มข้น 1.0 mM เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน	40

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	แสดงแถบโปรตีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS ที่มี พลาสมิด pET21a-CHK-E2 โคลนที่ 1 (pET21a-CHK-E2 -1) ที่มีการเหนี่ยวนำการสร้าง rE2 protein ที่อุณหภูมิ 37 °C, 28 °C และ 20 °C และ IPTG ความเข้มข้น 4.0 mM เปรียบเทียบกับ โปรตีนมาตรฐานด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R250	43
13	แสดงผลการศึกษาความจำเพาะของ rE2 protein กับ anti 5xHis antibody โดยวิธี Western blot	44
14	แสดงแถบโปรตีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS ที่มี พลาสมิด pET21a-CHK-E2 ที่มีการเหนี่ยวนำการสร้าง rE2 protein ที่อุณหภูมิ 20 °C และ IPTG ความเข้มข้น 0.0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 mM เปรียบเทียบกับ โปรตีนมาตรฐานด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R250	45
15	แสดงผลการศึกษาความจำเพาะของ rE2 protein ที่ได้จากการเหนี่ยวนำการสร้าง rE2 protein ที่อุณหภูมิ 20 °C และ IPTG ความเข้มข้น 0.0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 mM กับ anti 5xHis antibody โดยวิธี Western blot	46
16	แสดงแถบโปรตีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>E. coli</i> สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS ที่มี พลาสมิด pET21a-CHK-E2 ที่มีการเหนี่ยวนำการสร้าง rE2 protein ที่อุณหภูมิ 20 °C และ IPTG ความเข้มข้น 0.5 mM โดยเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 หลังเติม IPTG เปรียบเทียบกับ โปรตีนมาตรฐานด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R250	47
17	แสดงผลการศึกษาความจำเพาะของ rE2 protein ที่ได้จากการการเหนี่ยวนำการสร้าง rE2 protein ที่อุณหภูมิ 20 °C และ IPTG ความเข้มข้น 0.5 mM โดยเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 หลังเติม IPTG กับ anti 5xHis antibody โดยวิธี Western blot	48

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
18 แสดงแถบโปรตีน rE2 protein ที่สกัดโดยใช้ 0.5% N-laurylsarcosine เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานโดยวิธี SDS-PAGE และวิธี Western blot	52
19 แสดงผล Western blot ของ rE2 protein ที่สกัดโดยใช้ 0.5% N-laurylsarcosine โดยใช้ anti 5xHis antibody เจือจาง 1:1000 และใช้ตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคไข้วัดข้ออยู่กลายเจือจาง 1:50	54
20 แสดงผล dot blot ระหว่าง rE2 protein ปริมาณ 2 ไมโครกรัม กับตัวอย่างซีรัม	56
21 แสดงผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสชิคุนกุนยาด้วยวิธี IC โดยใช้ sample buffer สูตร 1 และ สูตร 2	58
22 แสดงผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสชิคุนกุนยาด้วยวิธี IC โดยใช้ sample buffer สูตร 1 และสูตรที่ 2 ที่เติม 1% BSA	59
23 แสดงผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสชิคุนกุนยาด้วยวิธี IC โดยใช้ sample buffer สูตร 1 และสูตรที่ 2 ที่เติม 1% sucrose	60
ภาพผนวกที่	
ข 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD 595 nm กับ ความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน	83
ค 1 ข้อมูลโครงสร้างจีโนมของไวรัสชิคุนกุนยา สายพันธุ์ Ross (AF490259)	86
ค 2 โครงสร้างจีโนมของไวรัสชิคุนกุนยา สายพันธุ์ Ross (AF490259)	86
ค 3 ข้อมูลโครงสร้างยีน E2 ของไวรัสชิคุนกุนยา สายพันธุ์ Ross (AF490259)	87
ค 4 โครงสร้างจีโนมของพลาสมิด pGEM [®] -T Easy	88
ค 5 โครงสร้างจีโนมของพลาสมิด pET21a	89
ง 1 ผลการ Blast นิวคลีโอไทด์ของยีน E2 บน pG96EMT-CHK-E2 กับฐานข้อมูล NCBI	91
ง 2 ผลการ Blast กรดอะมิโนของโปรตีน E2 บน pGEMT-CHK-E2 กับฐานข้อมูล NCBI	92

การสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน E2 ของไวรัสชิคุนกุนยา เพื่อใช้พัฒนา ชุดตรวจโรคชิคุนกุนยา

Cloning and Expression of Envelope Protein E2 of Chikungunya Virus for Application of Diagnosis

คำนำ

โรคไข้ปวดข้อยุงลายหรือโรคไข้ปวดข้อยุงลายเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญในหลายประเทศทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศในเขตร้อนชื้น มักพบการระบาดในช่วงฤดูฝน โรคไข้ปวดข้อยุงลายเกิดจากการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา โดยมียุงลาย (*Aedes mosquitoes*) เป็นพาหะนำโรค ผู้ป่วยมักมีอาการคล้ายไข้เลือดออก แต่แตกต่างกันที่ไม่มี การรั่วของพลาสมาออกมาออกเส้นเลือด ทำให้ไม่พบผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงมากจนถึงมีการช็อก

โรคไข้ปวดข้อยุงลาย พบการระบาดครั้งแรกกลางปี ค.ศ.1950 ที่ประเทศแทนซาเนีย ในแถบแอฟริกาตะวันออก จากนั้นเริ่มมีการระบาดในมหาสมุทรอินเดีย โดยพบการระบาด ครั้งใหญ่ในหมู่เกาะ Reunion มีผู้ติดเชื้อมากถึง 258,000 ราย จากประชากรทั้งสิ้น 770,000 คน ส่วนทวีปเอเชีย พบการระบาดครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ.1958 และประเทศไทยพบการระบาดครั้งแรกในปี ค.ศ.1962 จากนั้นเกิดการระบาดซ้ำอีกครั้งในปี ค.ศ.1990 ต่อมาในปี ค.ศ. 2009 ประเทศไทยพบการระบาดของโรคไข้ปวดข้อยุงลายในหลายพื้นที่ครอบคลุมถึง 28 จังหวัด โดยเฉพาะพื้นที่ในจังหวัด ทางภาคใต้ คือ นราธิวาส (7,011 ราย), ปัตตานี (2,942 ราย), ยะลา (2,107 ราย) และสงขลา (9,078 ราย) ข้อมูลล่าสุดเมื่อวันที่ 27 พฤษภาคม 2009 จากสำนักโรคระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค รายงานถึงยอดจำนวนผู้ป่วยโรคไข้ปวดข้อยุงลาย จำนวน 22,276 ราย

เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีวัคซีนหรือยาต้านไวรัสชิคุนกุนยาโดยตรง แม้ว่าในประเทศสหรัฐอเมริกาจะมีการวิจัยและพัฒนาวัคซีนไข้ปวดข้อยุงลายชนิดเชื้อตาย (inactivated Chikungunya vaccine) และชนิดเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ (live attenuated Chikungunya vaccine) โดยให้สายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทย เมื่อปี ค.ศ. 1962 เพื่อป้องกันโรคไข้ปวดข้อยุงลาย ทั้งนี้ยังอยู่ในช่วงทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนในอาสาสมัคร ดังนั้นการวิจัยและพัฒนา ชุดตรวจโรคไข้ปวดข้อยุงลาย ถือเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถป้องกันการระบาดของโรคไข้ปวดข้อยุงลายได้ โดยมี

รายงานการใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนเป็นวัสดุติบในชุดตรวจสอบ ซึ่งสามารถศึกษา และพัฒนาได้
อย่างรวดเร็ว อีกทั้งยังมีความปลอดภัยกว่าการใช้อนุภาคไวรัสซึ่งคุณภาพโดยตรง ซึ่งชุดตรวจสอบ
ที่ถูกพัฒนาขึ้นส่วนใหญ่อาศัยหลักการ immunochromatography (IC) หรือ enzyme-linked
immunosorbent assay (ELISA)



วัตถุประสงค์

1. เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน E2 ของเชื้อไวรัสซิกุนกุนยาสายพันธุ์ Ross
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของรีคอมบิแนนท์โปรตีน E2 ในการใช้เป็นวัตถุคิบในการพัฒนาชุดตรวจโรคไข้วัดข้อยูงลาย



การตรวจเอกสาร

1. โรคไข้ปวดข้อยุงลาย

โรคไข้ปวดข้อยุงลายเป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญในหลายประเทศทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศในเขตร้อนชื้น มักจะพบการระบาดในช่วงฤดูฝน โรคเกิดจากการ ติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา โดยมียุงลาย (*Aedes mosquitoes*) เป็นพาหะนำโรค มีอาการคล้าย ไข้เลือดออก แต่แตกต่างกันที่ไม่มีการรั่วของพลาสมาออกนอกเส้นเลือด ทำให้ไม่พบผู้ป่วย ที่มีอาการรุนแรงมาก จนถึงมีการช็อก (Power, 2007)

โรคไข้ปวดข้อยุงลาย พบการระบาดครั้งแรกกลางปี ค.ศ.1950 ในประเทศแทนซาเนีย แถบแอฟริกาตะวันออก จากนั้นเริ่มมีการระบาดในมหาสมุทรอินเดีย โดยพบการระบาดครั้งใหญ่ ใน Reunion มีผู้ติดเชื้อถึง 258,000 ราย จากประชากรทั้งสิ้น 770,000 คน ในทวีปเอเชีย พบการระบาดครั้งแรก เมื่อปี ค.ศ.1958 ประเทศไทยพบการระบาดครั้งแรกในปี ค.ศ.1962 จากนั้นเกิดการระบาดซ้ำอีกครั้งในปี ค.ศ.1990 (Halstead, *et al.*, 1963, Robinson, 1995, Ross, 1956, Rezza, *et al.*, 2007, กรมควบคุมโรค, 2009)

ในปี ค.ศ. 2009 ประเทศไทยพบการระบาดของโรคไข้ปวดข้อยุงลายในหลายพื้นที่ ครอบคลุม ถึง 28 จังหวัด โดยเฉพาะพื้นที่ทางภาคใต้ คือ นราธิวาส (7,011 ราย), ปัตตานี (2,942 ราย), ยะลา (2,107 ราย) และสงขลา (9,078 ราย) ข้อมูลล่าสุดเมื่อวันที่ 27 พฤษภาคม 2009 จาก สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค รายงานถึงยอดจำนวนผู้ป่วยโรคไข้ปวดข้อยุงลาย จำนวน 22,276 ราย (กรมควบคุมโรค, 2009)

ในปี ค.ศ. 2010 การระบาดของโรคไข้ปวดข้อยุงลายในประเทศไทยได้ลดลง สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค รายงานถึงยอดจำนวนผู้ป่วยโรคไข้ปวดข้อยุงลาย จำนวน 2,000 ราย (กรมควบคุมโรค, 2010)

การระบาดของโรคไข้ปวดข้อยุงลายในแถบประเทศเอเชียจะเกิดการระบาดในลักษณะ Urban cycle ซึ่งจะแตกต่างจากการระบาดในกลุ่มประเทศแอฟริกาที่เกิดทั้งลักษณะ Rural cycle และ Urban cycle นอกจากนี้พาหะนำโรคในทวีปเอเชียจะมียุงลาย 2 ชนิด คือ *Ae. Aegypti* และ *Ae. albopitus* (Chevillon, *et al.*, 2008, Sourisseau, *et al.*, 2007)

2. อาการทางคลินิกสำหรับผู้ป่วยโรคไข้วัดข้อยุ้งลาย

ผู้ป่วยจะมีอาการไข้วัดข้ออย่างฉับพลัน มีผื่นแดงขึ้นตามร่างกายและอาจมีอาการคันร่วมด้วย โดยไข้วัดข้อมักเป็น Saddleback pattern คล้ายกับโรคไข้วัดข้อเลือดออก กล่าวคือ การที่มีไข้วัดข้อในระยะหนึ่งแล้วหายไป หลังจากนั้นจึงกลับมีไข้วัดข้อขึ้นมาใหม่อีกรอบ บางรายที่ไข้วัดข้ออาจพบอาการหนาวสั่นร่วมด้วย นอกจากนี้ อาจพบอาการตาแดง (conjunctival injection) แต่ไม่ค่อยพบจุดเลือดออกในตาขาว ส่วนใหญ่แล้วในเด็กจะมีอาการไม่รุนแรงเท่าในผู้ใหญ่ในผู้ใหญ่อาการที่เด่นชัดคืออาการปวดข้อ ซึ่งอาจพบข้ออักเสบได้ส่วนใหญ่มักจะเป็นที่ข้อเล็กๆ เช่น ข้อมือ ข้อเท้า อาการปวดข้อจะพบในหลายข้อ โดยเปลี่ยนตำแหน่งไปเรื่อยๆ (migratory polyarthritits) ผู้ป่วยจะมีอาการจะรุนแรงมาก จนบางครั้งขยับข้อไม่ได้ โดยอาการจะหายไปเองภายใน 1-12 สัปดาห์ ผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการปวดข้อเกิดขึ้นได้อีกภายใน 2-3 สัปดาห์ต่อมา และบางรายอาการปวดข้อจะอยู่ได้นานเป็นเดือน หรือเป็นปีไม่พบผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงถึงข้อ ซึ่ง เป็นข้อแตกต่างจากโรคไข้วัดข้อเลือดออก การตรวจ โดย tourniquet test อาจให้ผลบวก และพบจุดเลือดออก (petechiae) บริเวณผิวหนังได้ในผู้ป่วย บางราย (กรมควบคุมโรค, 2009)

2.1 ระยะเวลาของอาการทางข้อชนิดเรื้อรัง

อาการทางข้อเป็นอาการเด่นที่พบบ่อยในผู้ป่วยซิกุนกุนยา อาจมีอาการข้อบวมร่วมด้วย ส่วนมากเกิดในระยะเวลาเพียงช่วงสั้นๆ ยกเว้นบางรายที่มีอาการเรื้อรังซึ่งอาจสร้างความทรมานและความลำบากในการดำเนินชีวิตประจำวันให้แก่ผู้ป่วยได้ ผู้ป่วยซิกุนกุนยา ร้อยละ 57 (84 ราย จากทั้งหมด 147 ราย) มีอาการทางข้อยาวนานถึง 15 เดือน โดยในจำนวนนี้มีอาการทางข้อชนิด ต่อเนื่องร้อยละ 63 และชนิดกลับมาเป็นซ้ำร้อยละ 37 ผู้ป่วยที่มีอายุตั้งแต่ 45 ปี ขึ้นไปมีโอกาสสูง ที่จะเกิดอาการข้อเรื้อรัง ผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการทางข้อนานถึง 3 ปี (Sissoko *et al.*, 2009, Brington *et al.*, 1983)

2.2 อาการแทรกซ้อนทางระบบประสาท

การศึกษา Propective cohort ในกลุ่มผู้ป่วยซิกุนกุนยาที่ Central India Institute of Medical Sciences (CIIMS) ประเทศอินเดีย จำนวน 300 ราย พบผู้ป่วยที่มีอาการแทรกซ้อนทางระบบประสาท 49 ราย แบ่งเป็น Encephalitis 27 ราย myelopathy, neuropathy และ meloneuropathy อย่างละ 7 ราย และ myopathy 1 ราย ส่วนใหญ่อาการแทรกซ้อนทางประสาท

เกิดขึ้นภายใน 20 วันหลังจากเริ่มป่วย (Chandak *et al.*, 2009)

2.3 อาการของซิกุนกุญาในทารก

ทารกที่ติดเชื้อไวรัสซิกุนกุญา อาการทางคลินิกมักมีความแตกต่างจากผู้ใหญ่หลายประการ ในเด็กอายุ 1 ขวบที่ได้รับการวินิจฉัยโรคไข้วัดช้อยุงลายโดยการยืนยันด้วย IgM ที่สถาบันสุขภาพเด็กเมือง kottayam รัฐ Kerala ประเทศอินเดีย จำนวน 56 ราย พบว่าจะมีอาการไข้วัดช้อยุงลายร่วมกับอาการอย่างน้อย 1 อย่าง ดังนี้ seizure, loose stools, peripheral cyanosis, skin manifestations และ pedal edema นอกจากนี้อาจพบอาการขาบวม อาการซึม รับประทานอาหารได้น้อย อาการกระวนกระวาย ซึ่งเป็นอาการที่แตกต่างจากผู้ใหญ่ ส่วนอาการที่แสดง ทางผิวหนังสามารถพบได้ในผู้ป่วยทุกราย ผื่นมักขึ้นทั่วตัวเป็นแบบ generalized erythematous rashes ภายใน 2 วันแรกที่เริ่มมีไข้ ต่อมาจึงเปลี่ยนเป็นชนิด maculopapular rashes ในวันที่ 2 หลังวันเริ่มมีไข้และหายไปในวันที่ 6 ผู้ป่วยบางรายพบ vesicobullous lesion ซึ่งมัก ปรากฏในวันที่ 4 หลังวันเริ่มมีไข้โดยอาจพบผิวหนังลอกตามมาในวันที่ 6 สำหรับบริเวณ ที่พบผื่นดังกล่าว นอกจากตามลำตัวแล้วทั่วไปแล้ว ยังสามารถพบได้ที่ฝ่ามือฝ่าเท้าอีกด้วย (Valampampil, *et al.*, 2009)

ตารางที่ 1 ร้อยละของอาการและอาการแสดงต่างๆที่พบในผู้ป่วยโรคไข้ปวดข้อยุงลาย
(กรมควบคุมโรค, 2009)

คณะผู้ศึกษา	รจนา วัฒนรังสรรค์ และคณะ (n=126)	พิสิษฐวุฒิ อยุธยา และคณะ (n=77)	ธงชัย เลิศวิไลรัตนพงศ์ และคณะ (n=64)	ขจรศักดิ์ ศิลปโภชากุล และคณะ (n=45)	Suryawanshi SD et al.2009 (n=87)	Borgherini G et al. Reunion, 2007 (n=157)	Reunion Island, France, 2006	WHO guidelines	ร้อยละของอาการที่พบอยู่ในช่วง
ไข้	95.0	90.9	84.4	96.3	100.0	89.0	96.3	92.0	84.4 - 100.0
ปวดข้อ	99.0	84.4	82.8	89.3	100.0	96.1	96.6	87.0	82.8 - 100.0
ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ	70.0	77.9	31.3	-	-	-	61.6	-	31.3 - 77.9
มีผื่น	60.0	63.6	40.6	71.4	31.0	40.1	32.5	50.0	32.5 - 71.4
ปวดศีรษะ	85.0	44.2	54.7	81.8	55.1	47.1	58.1	62.0	44.2 - 85.0
ซีบวม	-	40.3	3.1	57.9	-	31.8	-	-	3.1 - 57.9
ปวดกระบอกตา	52.0	14.3	-	-	-	-	-	-	14.3 - 52.0
มีจุดเลือดออกใต้ผิวหนัง	-	1.3	-	-	-	-	-	-	1.3
อาเจียน	3.0	-	21.9	13.0	-	(GI symptoms) 47.1	-	-	13.0 - 21.9
อุจจาระร่วงเฉียบพลัน	-	-	3.1	9.0	-		-	-	3.1 - 9.0
ไอ	-	-	9.4	13.0	-	-	-	-	9.4 - 13.0

3. ไวรัลซิกนุกุนยา

ไวรัลซิกนุกุนยา หรือ Buggy Creek Virus จัดอยู่ในวงศ์ (Family) *Togaviridae* และสกุล (Genus) *Alphavirus* โครงสร้างอนุภาคเป็นรูปทรงกลม มีเปลือกหุ้มซึ่งประกอบด้วยเยื่อไขมัน และโปรตีน โครงสร้างจีโนมเป็น RNA สายเดี่ยวขนาด 11.8 kb ถอดรหัสได้เป็นโปรตีน 2 กลุ่ม คือ กลุ่มโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) ประกอบด้วย Capsid (C) และ Envelope (E) ส่วนอีกกลุ่มคือโปรตีนที่ไม่ได้เป็นโครงสร้าง (non-structural protein : NS) มี 4 ชนิด ได้แก่ NS1, NS2, NS3 และ NS4 (Chevillon, *et al.*, 2008, Strauss and Strauss, 1994)

โปรตีนโครงสร้างถูกสร้างจาก structural precursor protein ซึ่งประกอบด้วย ส่วนของโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น capsid, pE2 precursor, 6K และ E1 โดย pE2 precursor จะมีการปรับแต่งโปรตีนได้เป็นโปรตีน E2 และ E3 ส่วน non structural protein ถูกสร้างจาก p1234 precursor ประกอบด้วย NS1 เป็นโปรตีนในกระบวนการ การสังเคราะห์ RNA และกระบวนการ RNA capping และ โปรตีน NS2 เป็นเอนไซม์ RNA helicase และ proteinase, โปรตีน NS3 เป็นโปรตีนของเอนไซม์ replicase unit และสุดท้ายโปรตีน NS4 เป็นเอนไซม์ RNA polymerase (Chevillon, *et al.*, 2008)

4. การติดต่อและการแพร่กระจายของเชื้อ

โรคไข้ปวดข้อยุงลายติดต่อจากคนสู่คนได้โดยมียุงลาย *Aedes aegypti* เป็นพาหะนำโรคที่สำคัญเมื่อยุงลายตัวเมียกัดและดูดเลือดผู้ป่วยที่อยู่ในระยะไข้สูง ซึ่งเป็นระยะที่มีไวรัสอยู่ในกระแสเลือดเชื้อไวรัสจะเข้าสู่กระเพาะยุงและเพิ่มจำนวนมากขึ้นแล้วเดินทางเข้าสู่ต่อมน้ำลาย เมื่อยุงที่มีเชื้อไวรัลซิกนุกุนยาไปกัดคนอื่นก็จะปล่อยเชื้อไปยังคนที่ถูกกัด ทำให้คนได้รับเชื้อและเกิดอาการของโรคได้ โดยไวรัลซิกนุกุนยา จะมีระยะฟักตัวประมาณ 1-12 วันแต่ที่พบบ่อย คือ ประมาณ 2-3 วัน ระยะติดต่อ คือ ระยะไข้สูงประมาณวันที่ 2 – 4 ซึ่งเป็นระยะที่มีไวรัสอยู่ในกระแสเลือดมาก (กรมควบคุมโรค, 2009)

4.1 วงจรชีวิตของไวรัลซิกนุกุนยา

วงจรชีวิตของไวรัลซิกนุกุนยาเริ่มจากโปรตีน E2 จับที่เซลล์เจ้าบ้าน จากนั้นจะเกิดการหลอมรวมกันของอนุภาคไวรัสกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเจ้าบ้าน ไวรัลซิกนุกุนยาจะปลดปล่อยนิวคลีโอ

แคปซิดเข้าสู่ไซโตพลาสซึม และเริ่มการสังเคราะห์ RNA สายใหม่ พร้อมกับการสังเคราะห์โปรตีน โดย ssRNA สายบวกจะทำหน้าที่เป็น mRNA สำหรับการสังเคราะห์โปรตีนที่ไม่ใช่โครงสร้างของไวรัส (non structural protein) และ ส่วน ssRNA สายลบจะทำหน้าที่เป็นแม่แบบในการสร้าง ssRNA สายบวกสำหรับไวรัสตัวใหม่พร้อมกับเป็นแม่แบบในการสร้าง mRNA สำหรับการสังเคราะห์โปรตีนโครงสร้างของไวรัส ได้แก่ โปรตีนแคปซิด โปรตีนE3 โปรตีนE2 โปรตีน6K และโปรตีน E1 ซึ่งจะประกอบเป็นอนุภาคไวรัสและหลุดออกจากเซลล์เจ้าบ้านทางเยื่อหุ้มเซลล์ (Yadav J.S., 2006, Yadav, *et. al.*, 2007)

4.2 การติดเชื้อซิคุนกุญยาร่วมกับเชื้อชนิดอื่นๆ

โดยปกติการติดเชื้อซิคุนกุญยาร่วมกับเชื้อชนิดอื่นๆ นั้นพบได้ไม่บ่อย กรณีผู้ป่วยชายชาวฝรั่งเศสรายหนึ่งที่มีประวัติเดินทางไปประเทศอินเดียแล้วติดเชื้อซิคุนกุญยาร่วมกับเชื้ออะมีบิก (*Entamoeba histolytica*) โดยผู้ป่วยแสดงอาการของซิคุนกุญยาร่วมกับการถ่ายอุจจาระเป็นเลือด หลังจากได้รับการรักษาครบทั้ง 2 โรคดังกล่าวสามารถหายป่วยเป็นปกติโดยไม่มีภาวะแทรกซ้อนใดๆ และผู้ป่วยชาวเยอรมันรายหนึ่งที่มาท่องเที่ยวในประเทศอินเดียเช่นกัน ภายหลังได้ป่วยด้วยโรคไข้วอดข้ออยู่กลายร่วมกับไข้เลือดออก ซึ่งรายนี้พบอาการที่ผสมและเข้าได้กับทั้งสองโรค หากอาศัยเพียงอาการทางคลินิกอาจแยกจากกันลำบาก กรณีนี้จำเป็นต้องอาศัยผลตรวจทางห้องปฏิบัติการช่วยยืนยันการวินิจฉัย (Ezzedine, *et al.*, 2008 และ Schilling, *et al.*, 2009)

4.3 การติดเชื้อซิคุนกุญยาในหญิงตั้งครรภ์/ทารก แรกคลอด และปัญหาการติดเชื้อผ่านทางน้ำนม มารดา

ในกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่คลอดบุตรในโรงพยาบาลแห่งหนึ่ง บนเกาะ Reunion ตั้งแต่เดือนมีนาคม 2005 ถึง เดือนธันวาคม 2006 จำนวน 7,504 ราย พบมารดาที่ติดเชื้อซิคุนกุญยาระหว่างการคลอดบุตรสามารถถ่ายทอดเชื้อไปสู่ทารก (Vertical transmission) ได้สูงถึงร้อยละ 48.7 (19/39) โดยทารกที่ติดเชื้อจะเริ่มป่วยโดยเฉลี่ยในวันที่ 4 ภายหลังการคลอด (พบในช่วงตั้งแต่วันที่ 3-7 ภายหลังคลอด) อาการแสดงที่พบบ่อยในผู้ป่วยทารกคิดเป็นร้อยละ 100 ได้แก่ ไข้ ตื่นนอนไม่ค่อยได้ และอาการเจ็บปวด ส่วนอาการทางข้อและผิวหนังพบเพียงร้อยละ 78.9% (15/19) สำหรับอาการรุนแรงพบร้อยละ 52.6 (10/19) ซึ่งส่วนใหญ่ คือ encephalopathy (9/10) โดยการผ่าตัดคลอดแบบไม่เตรียมการ (Non elective caesarian section) จากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ไม่พบว่าสามารถป้องกันการถ่ายทอดเชื้อจากมารดาสู่ทารกได้แต่อย่างใด และจากการส่งตรวจยืนยันเชื้อทางห้องปฏิบัติการ (

ด้วยวิธี PCR) ในตัวอย่างน้ำนมมารดาที่ตรวจพบเชื้อซิกนุงุนยาในกระแสเลือดขณะนั้นจำนวน 22 ราย จากทั้งหมด 30 ราย ผลทั้งหมด พบว่าเป็นลบ ดังนั้นในขณะนี้จึงยังไม่มีหลักฐาน เพียงพอในกรณีการถ่ายทอดเชื้อผ่านทางน้ำนม (Gerardin, *et al.*, 2008)

5. การวินิจฉัยโรคและการรักษา

วิธีการแยกเชื้อไวรัสซิกนุงุนยาทำได้โดยการเพาะเลี้ยงไวรัสในเซลล์ขุ่น (C6/36), เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Monkey Kidney Monolayer) หรืออาจทำการเพาะเลี้ยงไวรัส ในหนูทดลอง ปัจจุบันนิยมใช้วิธี RT-PCR และ Serology โดยการตรวจหาแอนติบอดีชนิด IgM หรือ IgG ในการตรวจวินิจฉัยโรค ไข้วัดข้อยุงลาย ส่วนการตรวจวินิจฉัยแบบดั้งเดิม เช่น haemagglutination inhibition, complement binding immunofluorescence และ ELISA ก็ยังสามารถใช้ตรวจวินิจฉัยได้เช่นกัน (Clark and Casals, 1958, Pavri, 1964, Gadkari and Sheikh, 1984, Bodemann and Genton, 1977)

ปัจจุบันยังไม่มีการรักษาโรคไข้วัดข้อยุงลายที่จำเพาะเจาะจง (specific treatment) การรักษาเป็นการรักษาแบบประคับประคองตามอาการ (supportive treatment) เช่น ให้ยาลดอาการไข้วัดข้อ และการพักผ่อน ในปัจจุบัน chloroquin phosphate เป็นกลุ่มยาที่ใช้รักษาผู้ป่วยไข้วัดข้อยุงลายที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด (Brington, 1984)

นอกจากนี้ยังไม่มีวัคซีนหรือยาด้านไวรัสซิกนุงุนยา แม้ว่าในประเทศสหรัฐอเมริกาจะมีการวิจัยและพัฒนาวัคซีนไข้วัดข้อยุงลายชนิดเชื้อตาย (inactivated Chikungunya vaccine) และชนิดเชื้อเป็นอ่อนฤทธิ์ (live attenuated Chikungunya vaccine) โดยใช้สายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศไทย เมื่อปี ค.ศ. 1962 เพื่อป้องกันโรคไข้วัดข้อยุงลาย ขณะนี้ยังอยู่ในช่วงทดสอบความปลอดภัยของวัคซีนในอาสาสมัคร นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวัคซีนไข้วัดข้อยุงลายชนิด DNA vaccine อีกด้วย (Eckel *et al.*, 1970, Edelman, *et al.*, 2000, Hariison, *et al.*, 1971, Levitt, *et al.*, 1986, Muthumani, *et al.*, 2008, Tiwari, *et al.*, 2009)

6. การป้องกันและควบคุมการระบาดของเชื้อไวรัสซิกนุงุนยา

การป้องกันและควบคุมโรคไข้วัดข้อยุงลาย เป็นกิจกรรมที่สำคัญเร่งด่วน ซึ่งต้องดำเนินการก่อนโรคเกิด โดยมีพื้นที่เป้าหมายของการป้องกันโรคล่งหน้า คือ หมู่บ้านและชุมชน ที่อยู่รอบ

พื้นที่ระบาด การป้องกันโรคล่วงหน้าอย่างมีประสิทธิภาพ จึงควรปฏิบัติด้วยการ ให้ความรู้ด้าน สุขศึกษาแก่ประชาชน โดยประชาชนทราบถึงสาเหตุและปัจจัย ที่ทำให้ป่วย เป็นโรคไข้ปวดข้อยุง ลาย และการป้องกันโรคโดยการจัดการบ้านเรือน และสภาพแวดล้อมไม่ให้ มีแหล่งเพาะพันธุ์ยุง และเป็นที่อยู่อาศัยของยุงลาย รวมถึงวิธีการปฏิบัติเมื่อสงสัยว่า บุคคล ในบ้านป่วยเป็น โรคไข้ปวด ข้อยุงลาย นอกจากนี้การกำจัดแหล่งเพาะพันธุ์ยุงลาย เป็นการกำจัดต้นเหตุ ของการเกิดโรคไข้ปวด ข้อยุงลาย อย่างแท้จริงโดยอาจใช้วิธีทางกายภาพ โดยการปิดฝาภาชนะ กักเก็บน้ำโดยในชั้นแรก ต้องใช้ผ้ามุ้ง ผ้ายาง หรือพลาสติกมิดไว้ให้แน่นเพื่อป้องกันไม่ให้ยุงลาย ลอดเข้าไปวางไข่ หรือวิธี ทางชีวภาพ โดยการปล่อยปลากินลูกน้ำลงในภาชนะ 2-4 ตัว วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายประหยัดและ ปลอดภัยเหมาะสมสำหรับภาชนะเก็บน้ำใช้ที่ไม่สามารถปิดฝาได้ หรือวิธีทางเคมีโดยการใส่สาร เคมีฆ่าลูกน้ำยุงลาย ซึ่งองค์การอนามัยโลกแนะนำให้ใช้และรับรอง ความปลอดภัยควรใช้เฉพาะกับ ภาชนะเก็บน้ำที่ไม่สามารถปิดฝา หรือใส่ปลากินลูกน้ำได้ เพื่อเป็นการประหยัดการกำจัดยุงตัวเต็ม วัย การพ่นเคมีกำจัดยุงตัวเต็มวัยเป็นวิธีควบคุมยุงลาย ที่มีประสิทธิภาพสูง แต่ให้ผลระยะสั้นเหมาะ สำหรับช่วงที่เกิดการระบาดของโรค การป้องกัน โรคไข้ปวดข้อยุงลายโดยการควบคุมยุงพาหะจะ ให้ได้ผลดีนั้นจะต้องผสมผสาน ทั้งการควบคุมแหล่ง เพาะพันธุ์ยุงและการกำจัดยุงตัวเต็มวัยให้ ครอบคลุมพื้นที่สูงสุด ในชุมชนหนึ่งๆควรดำเนินการ ทุกครัวเรือน และจะต้องปฏิบัติอย่างต่อเนื่อง และสม่ำเสมอ (กรมควบคุมโรค, 2009)

การวิจัยและพัฒนาชุดตรวจโรคไข้ปวดข้อยุงลาย ถือเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถป้องกันการ ระบาดของโรคไข้ปวดข้อยุงลายได้ การเลือกใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนเป็นวัตถุดิบ ถือเป็นทาง เลือกหนึ่งที่ได้ได้รับความสนใจ เพราะสามารถศึกษาและพัฒนาได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ การใช้รี คอมบิแนนท์โปรตีนเมื่อใช้ยังมีความปลอดภัยมากกว่าการใช้อนุภาคไวรัสโดยตรง มีงานวิจัย จำนวนมากที่ศึกษาการใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน เป็นวัตถุดิบในการพัฒนาชุดตรวจโรคไข้ปวดข้อ ยุงลาย เช่น การใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน E1 และ E2 ที่ผลิตจาก Baculovirus expression system พัฒนาชุดตรวจโรคไข้ปวดข้อยุงลาย ชนิด ELISA (Cho *et al.*, 2008) และ การใช้รีคอมบิแนนท์ โปรตีน capsid ที่ผลิตจาก Baculovirus expression system พัฒนาชุดตรวจโรคไข้ปวดข้อยุงลาย ชนิด Immunochromatography (IC) (Cho *et al.*, 2008)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเพิ่มจำนวน *E2* gene ด้วยเทคนิค one step RT-PCR

ทำการสกัดแยกไวรัสชิคุนกุนยาสายพันธุ์ Ross จากสมองหนู โดยซึ่งสมองหนู ที่ถูกทำให้ติดเชื้อด้วยไวรัสชิคุนกุนยาสายพันธุ์ Ross ประมาณ 4 กรัม นำมาบด ใน normal saline (0.05% NaCl) 4 มิลลิลิตร จนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงและแบ่งส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร เพื่อนำมาสกัด RNA ด้วยชุดสกัด QIAamp[®] Viral RNA mini kit (Qiagen, Germany) โดย RNA ที่สกัดได้ ถูกนำมาเป็น RNA ต้นแบบ (RNA template) ในการเพิ่มจำนวนของยีน *E2* ด้วยชุด one step RT-PCR kit (Qiagen, Germany) โดยใช้ specific primer ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะกับส่วนของยีน *E2* ได้แก่ CHKE2F (AAGAATTCAGCACCAAGGACAACCTTCA AT) ที่ประกอบด้วย ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *EcoRI* คู่กับ CHKE2R (TTGCGGCCGCTTTAG CTGTTCT GATGCAGCA) ที่ประกอบด้วยตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *NotI* ที่อุณหภูมิ 50°C นาน 30 นาที, 95°C นาน 15 นาที จำนวน 1 รอบ และ denature ที่ 95°C นาน 1 นาที, annealing ที่ 55°C นาน 45 วินาที, extension ที่ 72°C นาน 1 นาที จำนวน 25 รอบ และ final extension ที่ 72°C นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นนำ PCR product มาตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 volt นาน 30 นาที อ่านผลภายใต้เครื่อง gel documentation หรือเครื่อง UV transilluminator และเก็บ PCR product ที่อุณหภูมิ 4°C สำหรับใช้ในการโคลนต่อไป

2. การโคลนยีน *E2* ของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา สายพันธุ์ Ross สำหรับผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน *E2* (rE2-protein)

นำ PCR product ของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา สายพันธุ์ Ross โคลนลงใน pGEM[®]-T Easy vector (Promega, USA) โดยทำ ligation ที่อุณหภูมิ 15°C นานข้ามคืน ให้ได้เป็น pGEMT-CHK-E2 ซึ่งจะถูกลำเลียงเข้าสู่เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ด้วยวิธี transformation หลังจากนั้นจึงตรวจคัดเลือกโคลนด้วยวิธีการ Blue-white colony screening (Sambrook *et al.*, 1989) และคุณสมบัติด้านยาปฏิชีวนะ ampicillin โดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร Luria-Bertani (LB) agar ที่มีการเติม X-gal, isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) และ ampicillin ทำการคัดเลือกโคโลนีสีขาว นำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB broth ที่เติม ampicillin และสกัดพลาสมิด ด้วย QIAprep spin miniprep (Qiagen, Germany) เพื่อนำมาตรวจสอบด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับยีน *E2* โดย

denature ที่ 95°C นาน 1 นาที, annealing ที่ 55°C นาน 45 วินาที, extension ที่ 72°C นาน 1 นาที จำนวน 25 รอบ และ final extension ที่ 72°C นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นนำ PCR product มาตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 volt นาน 30 นาที อ่านผลภายใต้เครื่อง gel documentation หรือเครื่อง UV transilluminator จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่มียีน *E2* มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB broth ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 100 µg/ml เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดและสกัดพลาสมิดด้วย QIAprep spin miniprep (Qiagen, Germany) สำหรับส่งวิเคราะห์หาลำดับเบสโดยการทำให้ automate sequencing ด้วยเครื่อง ABI Prism 3730XL DNA sequencer (Biobasic Inc., Singapore) และนำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ ไวรัสซิกนุกุนยา สายพันธุ์ Ross ที่มีรายงานไว้ใน GenBank หลังจากนั้นตัดพลาสมิด pGEMT-CHK-E2 ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่ออกเบสไว้ที่ปลาย 5' และ 3' ของยีนคือ *EcoRI* และ *NotI* สำหรับโคลนเข้าสู่ pET21a expression vector ที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *NotI* เพื่อสร้างเป็น pET21a-CHK-E2 แล้ว transform เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ Top10F' ทำการตรวจสอบโคลนจากคุณสมบัติด้านยาปฏิชีวนะ ampicillin และตรวจสอบยืนยันผลด้วยการทำ PCR โดย denature ที่ 95°C นาน 1 นาที, annealing ที่ 55°C นาน 45 วินาที, extension ที่ 72°C นาน 1 นาที จำนวน 25 รอบ และ final extension ที่ 72°C นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นนำ PCR product มาตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 volt นาน 30 นาที อ่านผลภายใต้เครื่อง gel documentation หรือเครื่อง UV transilluminator โดยใช้ CHKE2F เป็น forward primer และ CHKE2R เป็น reverse primer และนำพลาสมิดดังกล่าวมาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* ตรวจสอบ PCR product และ DNA fragment ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 volt นาน 30 นาทีอ่านผลภายใต้เครื่อง gel documentation หรือเครื่อง UV transilluminator จากนั้นทำการ transform พลาสมิดดังกล่าวเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) pLysS คัดเลือก transformant clone ด้วยวิธีการเดียวกัน

3. การผลิต rE2-protein

เลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) pLysS ที่มีพลาสมิด plasmid pET21-CHK-E2 ในอาหาร LB broth ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin (100 µg/ml) ในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืนและ subculture ลงในอาหารชนิดเดียวกันในสัดส่วน 1:30 แล้วจึงนำไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD 600 nm) ประมาณ 0.6 หลังจากนั้นจึงเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนด้วย IPTG ความเข้มข้น 1.0 mM และนำไปเลี้ยงต่อนาน 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ

20°C แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ไปตรวจสอบการสังเคราะห์โปรตีนด้วย 15% SDS-PAGE โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 3 มิลลิแอมแปร์ นาน 120 นาทีและนำแผ่นเจลมาย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R250

4. การตรวจสอบรูปแบบของ rE2-protein

นำเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) pLysS ที่มีพลาสมิด pET21a-CHK-E2 ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้สร้างโปรตีนปริมาตร 1 ml/tube มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C แยกเอาส่วนตะกอนมาตรวจสอบว่าโปรตีนที่สังเคราะห์นั้นอยู่ในรูปแบบใด โดยนำตะกอนเซลล์มาละลายในสารละลาย 1x LEW buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8.0) ปริมาตร 200 µl จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) ที่ 8 amplitude microns ตั้งเวลาการทำงาน 15 วินาที และหยุดการทำงาน 20 วินาที จนกระทั่งสารละลายมีลักษณะใส แล้วปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แยกส่วนใสด้านบนและตะกอน โดยส่วนใสด้านบนเป็นตัวแทนของ soluble protein และตะกอนเป็นตัวแทน insoluble protein (inclusion body) หลังจากนั้นนำทั้งสองส่วนมาตรวจสอบด้วย 15% SDS-PAGE, ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R250 และทำ Western blot analysis (ดูข้อ 7)

5. การหาสถานะที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำการสร้าง rE2-protein

5.1 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีน rE2-protein

นำเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) pLysS ที่มีพลาสมิด pET21a-CHK-E2 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin (100 µg/ml) ในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืนและ subculture ลงในอาหารชนิดเดียวกันในสัดส่วน 1:30 แล้วจึงนำไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD 600 nm) ประมาณ 0.6 หลังจากนั้นจึงเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนด้วย IPTG ความเข้มข้น 1.0 mM และนำไปเลี้ยงต่อ 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C, 28°C และ 20°C ตามลำดับ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ไปตรวจสอบการสังเคราะห์โปรตีนด้วย 15% SDS-PAGE โดย

ใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ ที่ 3 มิลลิแอมแปร์ นาน 120 นาทีและย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R250 และทำ Western blot analysis (ดูข้อ 7)

5.2 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ IPTG ในการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีน rE2-protein

นำเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) pLysS ที่มีพลาสมิด pET21a-CHK-E2 มาเพาะเลี้ยง ในอาหาร LB broth ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin (100 µg/ml) ในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืนและ subculture ลงในอาหารชนิดเดียวกัน ในสัดส่วน 1:30 แล้วจึงนำไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD 600 nm) ประมาณ 0.6 หลังจากนั้นจึงเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 mM และนำไปเลี้ยงต่อนาน 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20°C แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ไปตรวจสอบการสังเคราะห์โปรตีนด้วย 15% SDS-PAGE โดยใช้กระแสไฟฟ้าโดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ ที่ 3 มิลลิแอมแปร์ นาน 120 นาทีและย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R250 และทำ Western blot analysis (ดูข้อ 7)

5.3 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีน rE2-protein

นำเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) pLysS ที่มีพลาสมิด pET21a-CHK-E2 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin (100 µg/ml) ในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืนและ subculture ลงในอาหารชนิดเดียวกัน ในสัดส่วน 1:30 แล้วจึงนำไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD 600 nm) ประมาณ 0.6 หลังจากนั้นจึงเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนด้วย IPTG ความเข้มข้น 1.0 mM และนำไปเลี้ยงต่อนาน 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20°C โดยทำการเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3 และ 4 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ไปตรวจสอบการสังเคราะห์โปรตีนด้วย 15% SDS-PAGE โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ ที่ 3 มิลลิแอมแปร์ นาน 120 นาที และย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R250 และทำ Western blot analysis (ดูข้อ 7)

6. การสกัดแยก rE2-protein

นำเชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) pLysS ที่มีพลาสมิด pET21a-CHK-E2 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB medium ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin (100 µg/ml) ในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาข้ามคืน เพื่อเตรียมเป็น inoculums จากนั้นถ่ายเชื้อ inoculums สู่อาหาร LB medium ปริมาตร 1 ลิตร ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin (100 µg/ml) ในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD 600 nm) ประมาณ 0.6 หลังจากนั้นจึงเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 mM และนำไปเลี้ยงต่อ 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 20°C จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เก็บตะกอนเซลล์มาละลายใน 1x IB wash buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 1% Triton X-100) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เติม lysozyme (100 µg/ml) นำไปบ่มที่ 30°C และเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นความถี่สูง (sonicate) ที่ 8 amplitude microns โดยตั้งเวลาการทำงาน 15 วินาที และหยุดการทำงาน 20 วินาที จนกระทั่งสารละลายมีลักษณะใส จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่ 4°C เก็บส่วนตะกอน (inclusion bodies) มาเติม 1x IB wash buffer (20mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 1% Triton X-100) 40 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่ 4°C นำตะกอนมาละลายด้วย 1x IB solubilization buffer (500 mM CAPS pH 11.0, 0.5% N-laurylsarcosine, 1 mM DTT) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เก็บส่วนใส (rE2-protein) ไปทำ dialysis และ protein refolding (ภาคผนวก ข)

7. การทำ Western blot analysis

นำ rE2 protein ที่สกัดได้มาแยกขนาดด้วย 15% SDS-PAGE โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 90 volt นาน 120 นาที แล้วย้ายโปรตีนจากเจลลงใน nitrocellulose membrane (Whatman, Germany) ด้วยเครื่อง electro blotting โดยมีวิธีการดังนี้ แช่ nitrocellulose membrane และกระดาษกรอง (3M) ลงใน transfer buffer ที่เย็น จากนั้นประกอบชุดสำหรับการ transfer โดยเรียงตามลำดับ ดังนี้ กระดาษกรอง เจล nitrocellulose membrane และกระดาษกรอง แล้วจึง transfer ด้วยกระแสไฟฟ้า 14 volt นานข้ามคืน จากนั้นนำ membrane ไปตรวจสอบด้วยการทำ blotting ดังนี้ ชั้บ membrane ให้แห้งพอหมาดๆ และบล็อกด้วย blocking buffer (2% BSA ใน 1x PBST (phosphate-buffer saline

ที่มี 0.05% Tween 20)) นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำ membrane ออกมาซักพอดหมาดๆ แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมงใน anti-penta His antibody (Qiagen, germany) ที่เจือจางด้วย blocking buffer อัตราส่วน 1:1000 หรือตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคไข้วคข้ออักเสบ (pooled serum) ที่ทำการเจือจางด้วย blocking buffer 1:50 (1° antibodies) หลังจากนั้นล้าง membrane ด้วย 1x PBST 3 ครั้งๆละ 5 นาที และซัก membrane พอดหมาดๆ เสร็จแล้วนำ membrane บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมงใน rabbit anti-mouse peroxidase (DAKO, Denmark) หรือ goat anti-human peroxidase (DAKO, Denmark) (2° antibodies) ที่เจือจางด้วย blocking buffer อัตราส่วน 1:1000 แล้วจึงล้าง membrane ด้วย 1x PBST 3 ครั้งๆละ 5 นาที และล้างด้วย PBS 1 ครั้งจากนั้นจึงเติม substrate DAB (3, 3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride dehydrate) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5-10 นาทีและหยุดปฏิกิริยาโดยการล้างด้วยน้ำกลั่น

8. การทำ dot blot

นำ nitrocellulose membrane แช่ในน้ำกลั่นพอดหมาด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นหยด rE2-protein ลงบน nitrocellulose membrane โดยให้มีความเข้มข้น 2 µg/µl แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที ทำการบล็อก membrane ด้วย blocking buffer (5% dry skim milk ใน 1x PBST) นาน 20 นาที จากนั้นล้าง membrane 3 ครั้งด้วย 1xPBST (phosphate-buffer saline ที่มี 0.05% Tween 20) และเติมตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคไข้วคข้ออักเสบ (pooled serum) ที่ทำการเจือจางด้วย blocking buffer ที่อัตราส่วน 1:10 และ 1:50 (1° antibodies) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้าง membrane 3 ครั้งด้วย 1xPBST 3 ครั้งๆละ 5 นาทีและซัก membrane พอดหมาดๆ จากนั้นนำ membrane มาบ่มที่ 37°C นาน 30 นาที ใน goat anti-human peroxidase (2° antibodies) (DAKO, Denmark) ที่เจือจางด้วย blocking buffer ที่อัตราส่วน 1:1000 แล้วล้าง membrane ด้วย 1x PBST 3 ครั้งและ 1x PBS 1 ครั้ง จากนั้นเติม substrate DAP (2, 6 dichloro indophenol) แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5-10 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วย 5% acetic acid ปริมาตร 5 ml หรือจันท่วม membrane

9. การศึกษาเบื้องต้นสำหรับการพัฒนาชุดตรวจโรคไข้ปวดข้อยูงลาย โดยการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสชิคุนกุนยา ชนิด Immunochromatography (IC)

9.1 การเตรียม protein A gold colloidal conjugate

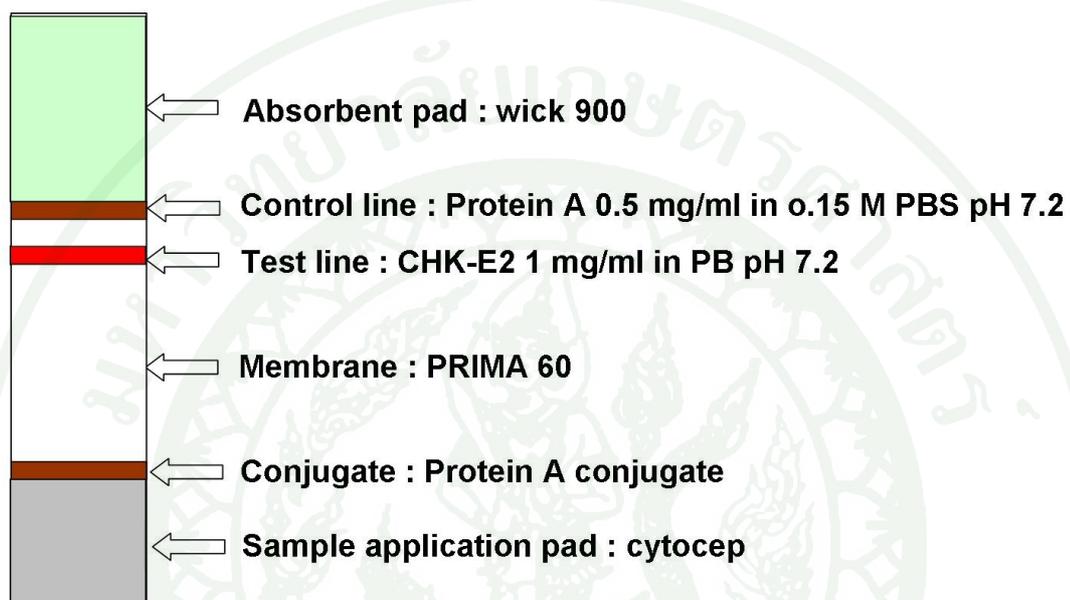
ทำการผสม protein A 0.6 μg กับ 1 มิลลิลิตรของ colloidal gold ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นทำการเติม 1% polyethylene glycol (PEG) ทำการผสมต่ออีก 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เก็บส่วนตะกอนมาละลายใน gold diluent (1% BSA ใน 0.05 M Na_2HPO_4) ทำการกรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 μm จากนั้นนำไปฉีดพ่นบน conjugate pad (GF33)

9.2 การเตรียม control line (protein A) และ test line (rE2-protein)

ละลาย protein A 0.5 มิลลิกรัม ด้วย 0.5 M PBS pH 7.2 ทำการกรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 μm จากนั้นนำไปฉีดพ่นบน membrane (PRIMA 60) เพื่อเป็น control line และ ละลาย rE2-protein 1.0 มิลลิกรัม ด้วย 0.5 M PB pH 7.2 ทำการกรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 μm จากนั้นนำไปฉีดพ่นบน membrane (PRIMA 60) เพื่อเป็น test line นำไปอบที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที

9.3 การประกอบชุดตรวจโรคไข้ปวดข้อยูงลาย ชนิด IC

นำแผ่น membrane จากข้อ 9.2 มาประกอบกับ conjugate pad จากข้อ 9.1, sample pad และ wick pad ดังรูปที่ จากนั้นนำไปตัดให้เป็นแถบ strip ด้วยเครื่อง Guillotine Cutting Module (BioDot, USA) นำ strip ที่ตัดแล้ว มาประกอบเข้ากับกลไกสำหรับใส่ strip จากนั้นนำไปทดสอบกับตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคไข้ปวดข้อยูงลายและตัวอย่างซีรัมคนปกติ



ภาพที่ 1 แสดงส่วนประกอบของชุดตรวจโรคไข้ปวดข้อยุ่งลายชนิด IC

10. การตรวจตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคไข้วัดข้ออักเสบด้วยชุดตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัส ชิคุนกุญา ชนิด IC

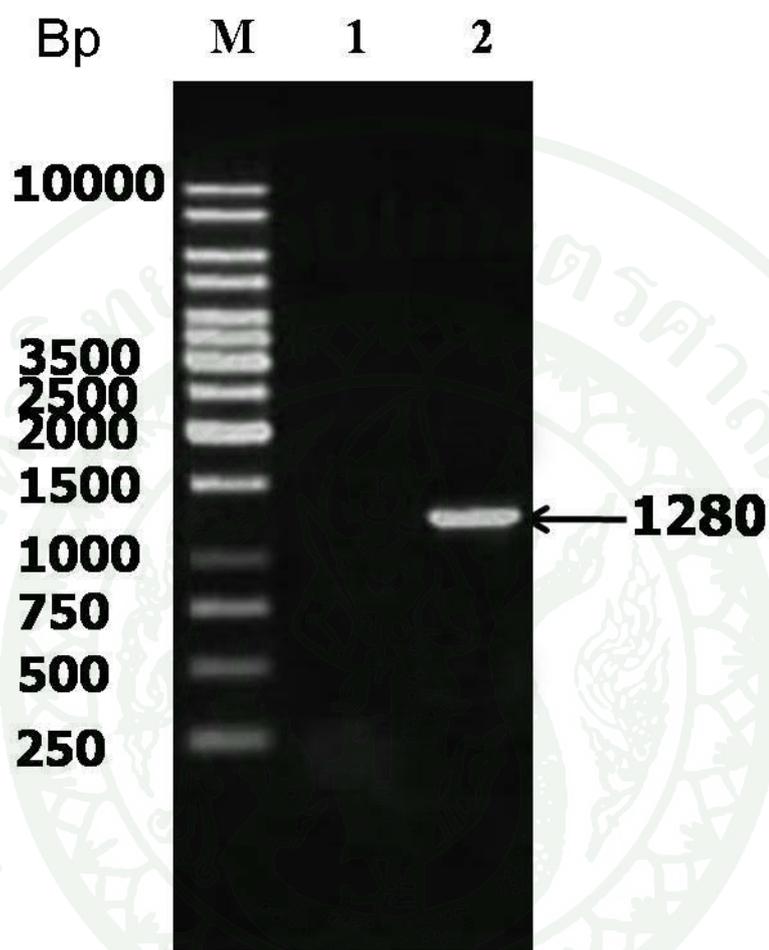
ทำการเจือจางตัวอย่างซีรัมที่อัตราส่วน 1:20 ด้วย sample buffer โดยใช้ sample buffer ในการทดสอบเบื้องต้น 2 สูตร คือ สูตรที่ 1 (10 mM PB, 0.1%NaN₃, 0.1% 4 aminoantipyrine, 0.1% Tween 20) และสูตรที่ 2 (10 mM PB, 0.1%NaN₃, 0.1% Tween 20) โดยใช้ตัวอย่างซีรัม 5 ไมโครลิตร เจือจางใน sample buffer 95 ไมโครลิตร เติมนลงบนหลุมหยอดตัวอย่าง อ่านผลภายใน 15 นาที โดยถ้าขึ้น 2 แถบทั้ง test line และ control line แปลผลเป็นบวก หมายความว่า ตัวอย่างซีรัมดังกล่าวพบแอนติบอดีต่อไวรัสชิคุนกุญา และถ้าขึ้น 1 แถบ ที่ control line แปลผลเป็นลบ หมายความว่า ตัวอย่างซีรัมดังกล่าวไม่พบแอนติบอดีต่อไวรัสชิคุนกุญา

จากนั้นทำการปรับส่วนผสมของ sample buffer ทั้ง 2 สูตร โดยการเติม 1% NaCl ได้เป็น sample buffer สูตรที่ 3 และ สูตรที่ 4 เมื่อเติม 1% BSA ได้เป็น sample buffer สูตรที่ 5 และ สูตรที่ 6 และเติม 1% sucrose ได้เป็น sample buffer สูตรที่ 7 และ สูตรที่ 8 ตามลำดับ

ผลและวิจารณ์

1. การเพิ่มจำนวน *E2* gene ด้วยเทคนิค one step RT-PCR

จากการใช้เทคนิค RT-PCR ในการสังเคราะห์ยีน *E2* ของเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา สายพันธุ์ Ross ด้วย primer CHKE2F คู่กับ CHKE2R พบว่าได้ PCR product ที่มีขนาด 1,280 bp โดยที่ PCR product ได้รวมส่วนของจุดตัดเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ซึ่งมี 6 bp และ *NotI* อีก 8 bp ที่ออกแบบไว้บน primer โดยยีน *E2* ของไวรัสชิคุนกุนยา สายพันธุ์ Ross ที่มีรายงานไว้ใน GenBank (AF490259.2) มีขนาด 1266 bp เมื่อนำมาแยกขนาดด้วย 1% agarose gel electrophoresis (ภาพที่ 2) การสังเคราะห์ยีน *E2* โดยใช้ primer ดังกล่าวข้างต้นมีจุดประสงค์เพื่อให้เกิดความสะดวกในการโคลน โดยไม่ต้องกังวลกับทิศทางของยีนในขั้นตอนการโคลนลงใน pET21a expression vector ทำให้สามารถตัดยีนออกมาใช้ โดยที่กรอบการอ่านลำดับเบสยังมีความถูกต้อง



ภาพที่ 2 แสดงแถบดีเอ็นเอจากการทำ RT-PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis, Lane M; 1kb DNA ladder (bp), lane 1; negative control (distilled water), lane 2; amplified CHK-E2 ที่มีขนาด 1,280 bp

2. การสร้าง recombinant plasmid pET21a-CHK-E2

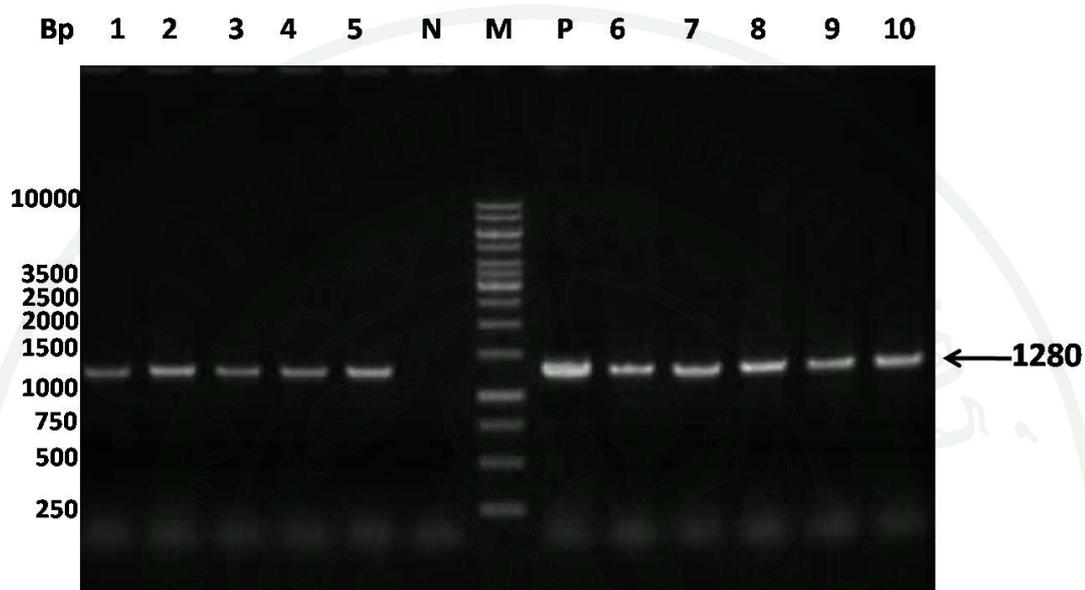
เมื่อนำ PCR product ของยีน *E2* ขนาด 1,280 bp ของเชื้อไวรัสซิกนุกุนยา สายพันธุ์ Ross โคลนลงใน pGEM[®]-T Easy vector ด้วยวิธี ligation และถ่ายเข้าสู่เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ด้วยการทำให้ transformation พบว่ามีโคโลนีสีขาวเจริญบนอาหาร LB agar ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin, X-gal และ IPTG การที่โคโลนีมีสีขาวเป็นผลมาจากการคัดเลือกโคโลนีด้วยวิธี blue-white screening โดยที่ยีน *E2* แทรกเข้าไปในส่วน of β -galactosidase (*lac Z*) gene ซึ่งเป็น cloning site ของ พลาสมิด pGEM[®]-T Easy vector ส่งผลให้เกิดกระบวนการ insertional inactivation ทำให้กิจกรรมของยีน *lacZ* สูญเสียไปไม่เกิดการสร้างเอ็นไซม์ออกมาย่อยสาร X-gal ที่ spread ลงบนผิวอาหารแข็งโคโลนีจึงเป็นสีขาว (Sambrook *et al.*, 1989) นอกจากนี้การที่เชื้อ *E. coli* สามารถเจริญได้บนอาหารแข็งที่มียาปฏิชีวนะดังกล่าวข้างต้นนั้น ก็เนื่องจากเชื้อเหล่านี้ ได้รับพลาสมิดที่มี ampicillin resistant gene เข้าไปในเซลล์ จึงสามารถสังเคราะห์เอ็นไซม์ ออกมาย่อยสลายยาปฏิชีวนะดังกล่าวและเจริญบนผิวอาหารได้ (Sambrook and Russel, 2001) เมื่อคัดเลือกโคโลนีที่ให้ผลบวกจากการทดสอบข้างต้น 10 โคโลนีมาตรวจสอบยืนยันผลด้วยการทำ PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับยีนคือ CHKE2F คู่กับ CHKE2R พบว่าทุกโคโลนีให้ PCR product ที่มีขนาดตรงกับยีน *E2* จากเชื้อไวรัสซิกนุกุนยา สายพันธุ์ Ross เมื่อแยกขนาดด้วย 1% agarose gel electrophoresis และตั้งชื่อโคโลนีว่า pGEMT-CHK-E2-1, pGEMT-CHK-E2-2, pGEMT-CHK-E2-3, pGEMT-CHK-E2-4, pGEMT-CHK-E2-5, pGEMT-CHK-E2-6, pGEMT-CHK-E2-7, pGEMT-CHK-E2-8, pGEMT-CHK-E2-9 และ pGEMT-CHK-E2-10 ตามลำดับ (ภาพที่ 3)

เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *E2* ใน pGEMT-CHK-E2 โดยการทำให้ automate sequencing และนำลำดับเบสที่ได้จากการวิเคราะห์มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของไวรัสซิกนุกุนยา สายพันธุ์ Ross (AF490259.2) และสายพันธุ์อื่นๆ ที่มีรายงานใน GenBank เช่น S27- African prototype (NC_004162), TSI-GSD-218 (L37661) และ Wuerzburg (EU037962) พบว่า ยีน *E2* ใน pGEMT-CHK-E2-1 มีความคล้ายกันถึง 99 เปอร์เซ็นต์ ทั้งในส่วนของลำดับเบส (1,266 เบส) และลำดับกรดอะมิโน (422 กรดอะมิโน) เมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสซิกนุกุนยา สายพันธุ์ Ross แม้ว่ากรดอะมิโนลำดับที่ 88 จะเปลี่ยนจาก serine เป็น threonine แต่คาดว่าจะไม่ส่งผลต่อโครงสร้างโดยรวมของโปรตีนเพราะทั้ง serine และ threonine ต่างก็มี hydroxyl group ที่ side chain เหมือนกัน (Livingstone *et al.*, 1993) และเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ พบว่ามีความคล้ายกันมากกว่า 94 เปอร์เซ็นต์ทั้งในส่วน of ลำดับเบส (1,266 เบส) และลำดับกรดอะมิโน (422 กรดอะมิโน) (ภาพที่ 4 และ 5) จากนั้นนำเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ที่มีพลาสมิด pGEMT-CHK-E2 โคลน pGEMT-

CHK-E2-1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติม ampicillin เพื่อเพิ่มปริมาณ พลาสมิด ทำการสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด QIAprep Spin Miniprep

เมื่อนำชิ้นยีน E2 ที่ได้จากการตัดพลาสมิด pGEMT-CHK-E2-1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *NotI* เชื่อมต่อกับพลาสมิด pET21a vector ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน แล้ว transform เข้าสู่เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ Top10F' นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่เติม ampicillin คัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหารดังกล่าวมายืนยันผลด้วยการทำ PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับยีน คือ CHKE2F คู่กับ CHKE2R พบว่ามี 6 โคโลนี จาก 7 โคโลนี ให้ PCR product ที่มีขนาดตรงกับยีน E2 จากเชื้อไวรัสซิกุนกุนยา สายพันธุ์ Ross เมื่อแยกขนาดด้วย 1% agarose gel electrophoresis (ภาพที่ 5) ซึ่งให้ชื่อว่า pET21a-CHK-E2-1, pET21a-CHK-E2-2, pET21a-CHK-E2-3, pET21a-CHK-E2-4, pET21a-CHK-E2-5 และ pET21a-CHK-E2-6 จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงโคลนดังกล่าวในอาหารเหลว LB ที่เติม ampicillin เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดและสกัดพลาสมิด ด้วยชุดสกัดพลาสมิด QIAprep Spin Miniprep นำพลาสมิดดังกล่าวมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* เพื่อยืนยันทิศทางการเข้าเชื่อมระหว่าง ชิ้นยีน E2 และพลาสมิด pET21a โดยหากชิ้นยีน E2 เข้าเชื่อมในทิศทางที่ถูกต้องจะได้ชิ้น ดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ที่มีขนาด 6.3 กิโลเบส และ 300 เบส ตามลำดับ เมื่อแยกขนาดด้วย 1% agarose gel electrophoresis (ภาพที่ 7)

เมื่อสกัดพลาสมิด pET21a-CHK-E2 แล้ว transform เข้าสู่เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่เติม ampicillin คัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหารดังกล่าวมายืนยันผลด้วยการทำ PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะกับยีน คือ CHKE2F คู่กับ CHKE2R พบว่ามี 5 โคโลนีให้ PCR product ที่มีขนาดตรงกับยีน E2 จากเชื้อไวรัสซิกุนกุนยา สายพันธุ์ Ross เมื่อแยกขนาดด้วย 1% agarose gel electrophoresis (ภาพที่ 8) เมื่อนำพลาสมิด pET21a-CHK-E2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *NotI* พบว่าจะได้ดีเอ็นเอ 2 ชิ้น โดยชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่าจะเป็นพลาสมิด pET21a ซึ่งมีขนาด 5.4 กิโลเบสและชิ้นดีเอ็นเอ ที่มีขนาดเล็กกว่าจะเป็นยีน E2 ซึ่งมีขนาด 1,280 เบส เมื่อแยกขนาดด้วย 1% agarose gel electrophoresis (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 3 แสดงแถบดีเอ็นเอจากการทำ PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis, Lane M; 1kb DNA ladder (bp), lane N; negative control (Distilled water), lane P; positive control (PCR product จากข้อ 1), lane 1-10; pGEMT-CHK-E2-1 ถึง pGEMT-CHK-E2-10 ใน *E.coli* สายพันธุ์ JM 109


```

          310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CHKROSS   ATCCTGGCCCGATGTCCGAAAGGAGAAACTCTGACGGTGGGATTCACTGACAGTAGGAAGATTAGTCACTCATGTACGCACCCATTTACCACGACCCTC
CHKE2     .....
CHKS27    .....
CHKTSI218 .....
CHK_WUE   .....A.....G.....
          410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CHKROSS   CTGTGATAGCCGGGAAAAATTCATTCCCGACCGCAGCACGGTAAAGAGCTACCTTGCAGCACGTACGTGCAGAGCAACGCCGCAACTGCCGAGGAGAT
CHKE2     .....
CHKS27    .....
CHKTSI218 .....T.....T.....G..A.....C.....C..T.....
CHK_WUE   .....T.....T.....G.....A.....C.....C..A.....
          510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CHKROSS   AGAGGTACACATGCCCCAGACACCCTGATCGCACATTGCTGCACAACAGTCCGGCAACGTAAAGATCACAGTCAACGGCCGGACGGTGCGGTATAAG
CHKE2     .....
CHKS27    .....TA.T.A.....
CHKTSI218 .....T.....A.....A.....T..T.....TA.T.A.....C.....
CHK_WUE   .....AA.....T.....A.....C.....

```

ภาพที่ 4 (ต่อ) แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบสบนยีน *E2* ใน pGEMT-CHK-E2-1 กับไวรัสชิคุนกุนยาสายพันธุ์ต่างๆที่มีรายงานใน GenBank ได้แก่ สายพันธุ์ Ross (CHKROSS:AF490259.2) สายพันธุ์ S27- African prototype (CHKS27:NC_004162), สายพันธุ์ TSI-GSD-218 (CHKTSI218:L37661) และสายพันธุ์ Wuerzburg (CHK_WUE:EU037962) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป ClustalW Multiple Alignment และ BioEdit Sequence Alignment

```

      610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CHKROSS  TGTAAATTGCGGTGGCTCAAATGAAGGACTAATAACTACAGATAAAGTGATTAATAACTGCAAGGTTGATCAATGTCATGCCGCGGTACCAATCACAAAA
CHKE2    .....
CHKS27   .....
CHKTSI218 .....A.....CC.....C.....C.....
CHK_WUE  .....C.....C.....
      710      720      730      740      750      760      770      780      790      800
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CHKROSS  AGTGGCAGTATAACTCCCCTCTGGTCCCGCTAACGCTGAACCTCGGGACCCAAAAGGAAAAATTCACATCCCGTTTCCGCTGGCAAATGTGACATGCAG
CHKE2    .....
CHKS27   .....G.....A.....T
CHKTSI218 .A.....T.....T.....G.....G.....T.....T.....
CHK_WUE  .....T.....T.....G.....A.....
      810      820      830      840      850      860      870      880      890      900
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CHKROSS  GGTGCCTAAAGCAAGGAACCCACCGTGACGTACGGGAAAAACCAAGTCATCATGCTACTGTATCCTGACCACCAACTCCTGTCTTACGGGAGTATG
CHKE2    .....
CHKS27   .....
CHKTSI218 .....G.....A.....G.....G.....A.....
CHK_WUE  .....A.....A.....

```

ภาพที่ 4 (ต่อ) แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบสบนยีน *E2* ใน pGEMT-CHK-E2-1 กับไวรัสชิคุนกุนยาสายพันธุ์ต่างๆที่มีรายงานใน GenBank ได้แก่ สายพันธุ์ Ross (CHKROSS:AF490259.2) สายพันธุ์ S27- African prototype (CHKS27:NC_004162), สายพันธุ์ TSI-GSD-218 (CHKTSI218:L37661) และสายพันธุ์ Wuerzburg (CHK_WUE:EU037962) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป ClustalW Multiple Alignment และ BioEdit Sequence Alignment

```

          910          920          930          940          950          960          970          980          990          1000
          |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CHKROSS   GGAGAAGAACCAA...TATCAAGAAGAGTGGGTGACGCACAAGAAGGAGGTCGTGCTAACCGTGCCGACTGAAGGGCTCGAGGTTACGTGGGGCAACAACG
CHKE2     .....
CHKS27    .....
CHKTSI218 .....T.....A..AG.T.....C.....
CHK_WUE   .....T..T.....A.....C.....
          1010          1020          1030          1040          1050          1060          1070          1080          1090          1100
          |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CHKROSS   AGCGTATAAGTATTGGCCGAGTTATCTGCAAACGGTACAGCCACGGCCACCCGCATGAGATAATCTTGTACTATTATGAGCTGTACCCTACTATGAC
CHKE2     .....
CHKS27    .....
CHKTSI218 .....C.....CA.....T.....T.....
CHK_WUE   .....A.....T.....TC.....T.....C.....
          1110          1120          1130          1140          1150          1160          1170          1180          1190          1200
          |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CHKROSS   TGTAGTAGTTGTGTCAGTGGCCTCGTTCATACTCCTGTGTCGATGGTGGGTATGGCAGTGGGGATGTGCATGTGTGCACGACGCAGATGCATCACACCATAC
CHKE2     .....
CHKS27    .....
CHKTSI218 ...G.....G.....G.....T.....G...
CHK_WUE   .....A.....C.....G...T
    
```

ภาพที่ 4 (ต่อ) แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบสบนยีน *E2* ใน pGEMT-CHK-E2-1 กับไวรัสชิคุนกุนยาสายพันธุ์ต่างๆที่มีรายงานใน GenBank ได้แก่ สายพันธุ์ Ross (CHKROSS:AF490259.2) สายพันธุ์ S27- African prototype (CHKS27:NC_004162), สายพันธุ์ TSI-GSD-218 (CHKTSI218:L37661) และสายพันธุ์ Wuerzburg (CHK_WUE:EU037962) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป ClustalW Multiple Alignment และ BioEdit Sequence Alignment


```

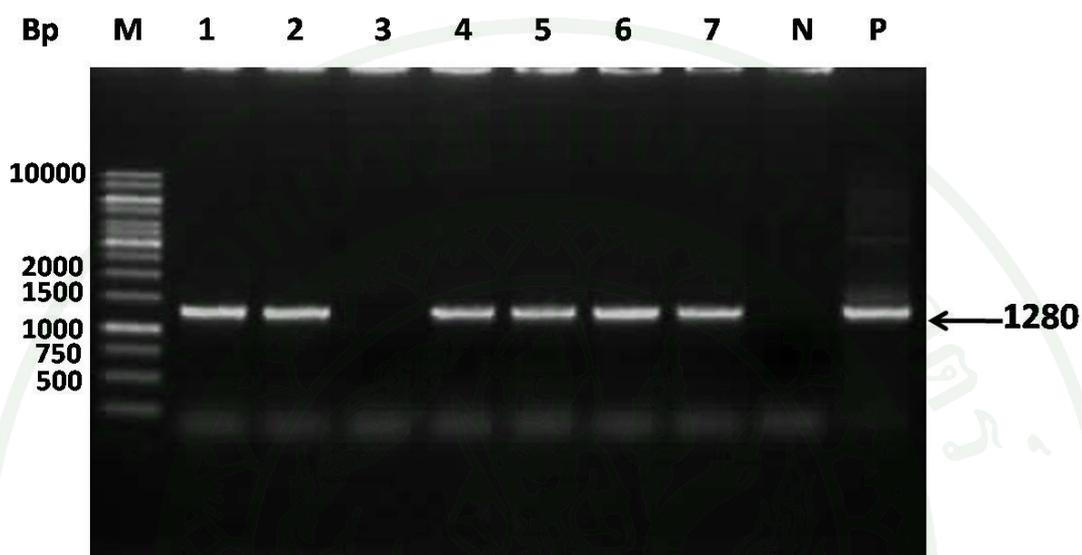
          310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CHKRoss aa  GEEPNYQEEWVTHKKEVVLTVPTGLEVTWGNNEPYKYWPQLSANGTAHGHPHEIILYYEELYPTMTVVVSVASFILLSMVGMVGMCMCARRRCITPY
CHKE2aa     .....
CHKS27aa    .....
CHKTSI218aa .....IR.....T.....V.....V.....
CHKWUEaa    .....M.....T.....T.....A.....

          410      420
.....|.....|.....|.....|.....|
CHKRoss aa  ELTPGATVPFLLSLICCIRTAK
CHKE2aa     .....
CHKS27aa    .....
CHKTSI218aa .....
CHKWUEaa    .....

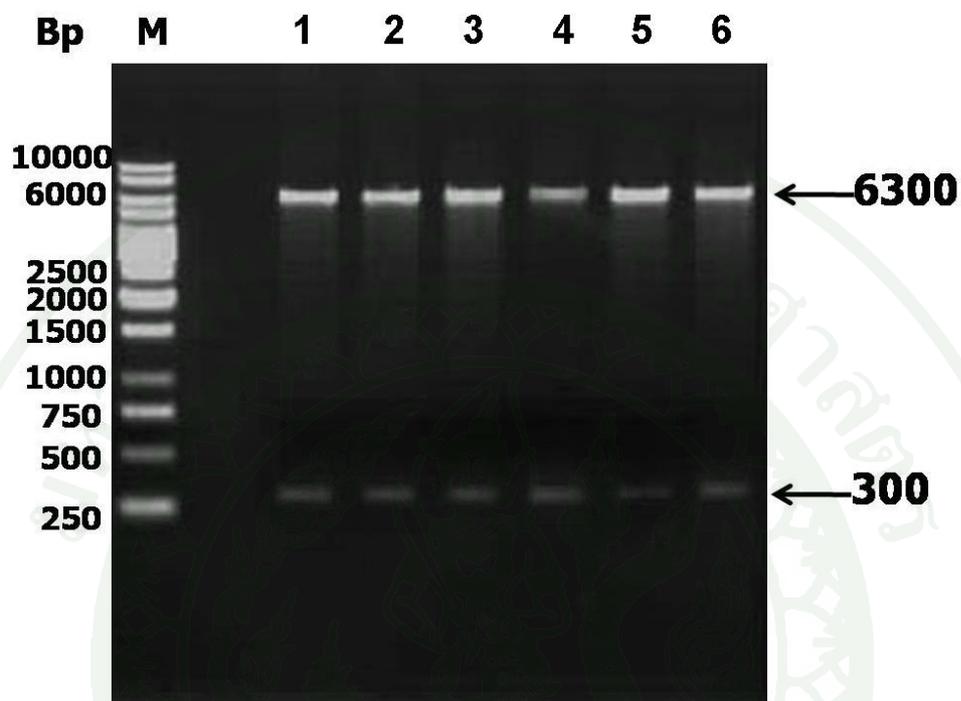
```

31

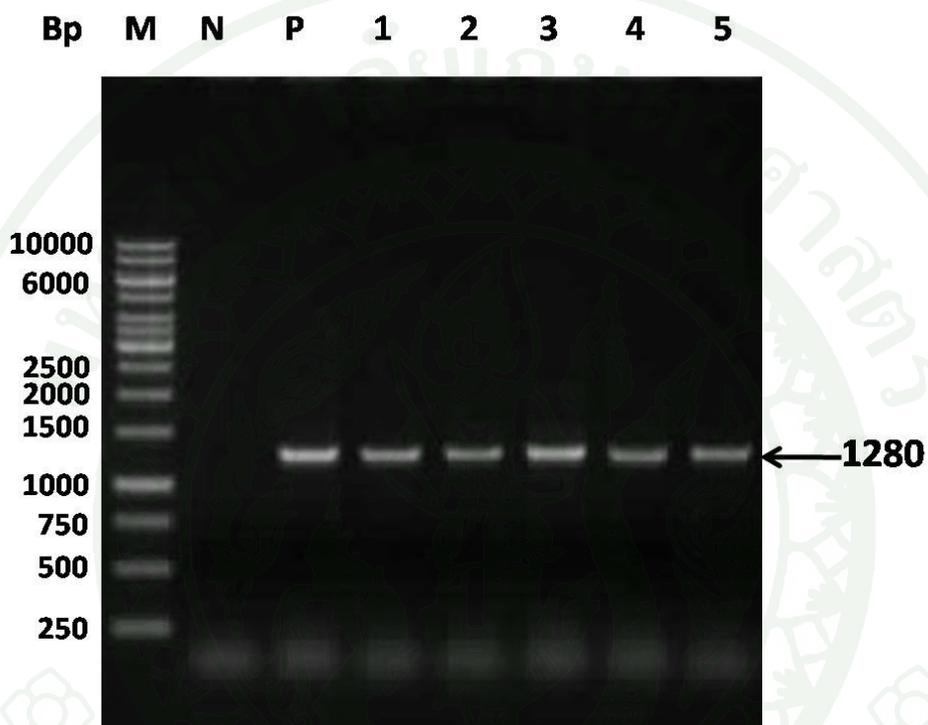
ภาพที่ 5 (ต่อ) แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน E2 ใน pGEMT-CHK-E2-1 กับไวรัสชิคุนกุนยาสายพันธุ์ต่างๆที่มีรายงานใน GenBank ได้แก่ สายพันธุ์ Ross (CHKROSS:AF490259.2) สายพันธุ์ S27-African prototype (CHKS27:NC_004162), สายพันธุ์ TSI-GSD-218 (CHKTSI218:L37661) และสายพันธุ์ Wuerzburg (CHK_WUE:EU037962) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป ClustalW Multiple Alignment และ BioEdit Sequence Alignment



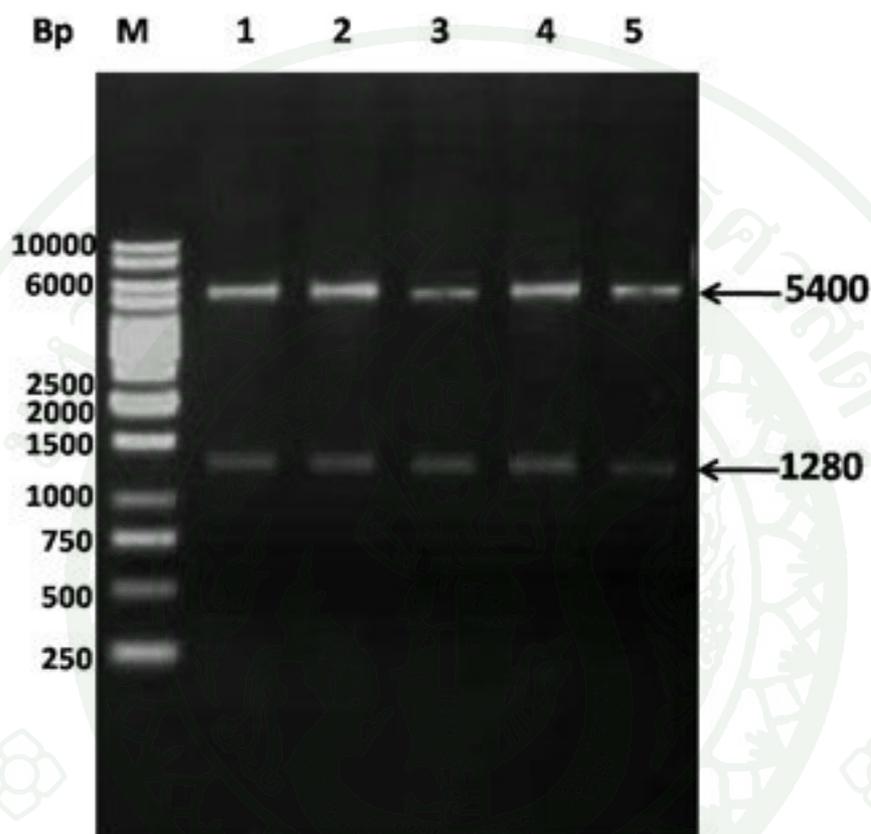
ภาพที่ 6 แสดงแถบดีเอ็นเอจากการทำ PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis, Lane M; 1kb DNA ladder (bp), lane N; negative control (distilled water), lane P; positive control (PCR product จากข้อ 1), lane 1-7; pET21a-CHK-E2-1, pET21a-CHK-E2-2, pET21a-CHK-E2-3, pET21a-CHK-E2-4, pET21a-CHK-E2-5, pET21a-CHK-E2-6 และ pET21a-CHK-E2-7 ตามลำดับ ใน *E. coli* สายพันธุ์ Top10F'



ภาพที่ 7 แสดงแถบดีเอ็นเอจากการตัดพลาสมิด pET21a-CHK-E2 ด้วยเอนไซม์ *XhoI* ด้วย 1% agarose gel electrophoresis, Lane M; 1kb DNA ladder (bp), lane 1-6; pET21a-CHK-E2-1, pET21a-CHK-E2-2, pET21a-CHK-E2-4, pET21a-CHK-E2-5, pET21a-CHK-E2-6 และ pET21a-CHK-E2-7 ใน *E. coli* สายพันธุ์ Top10F'



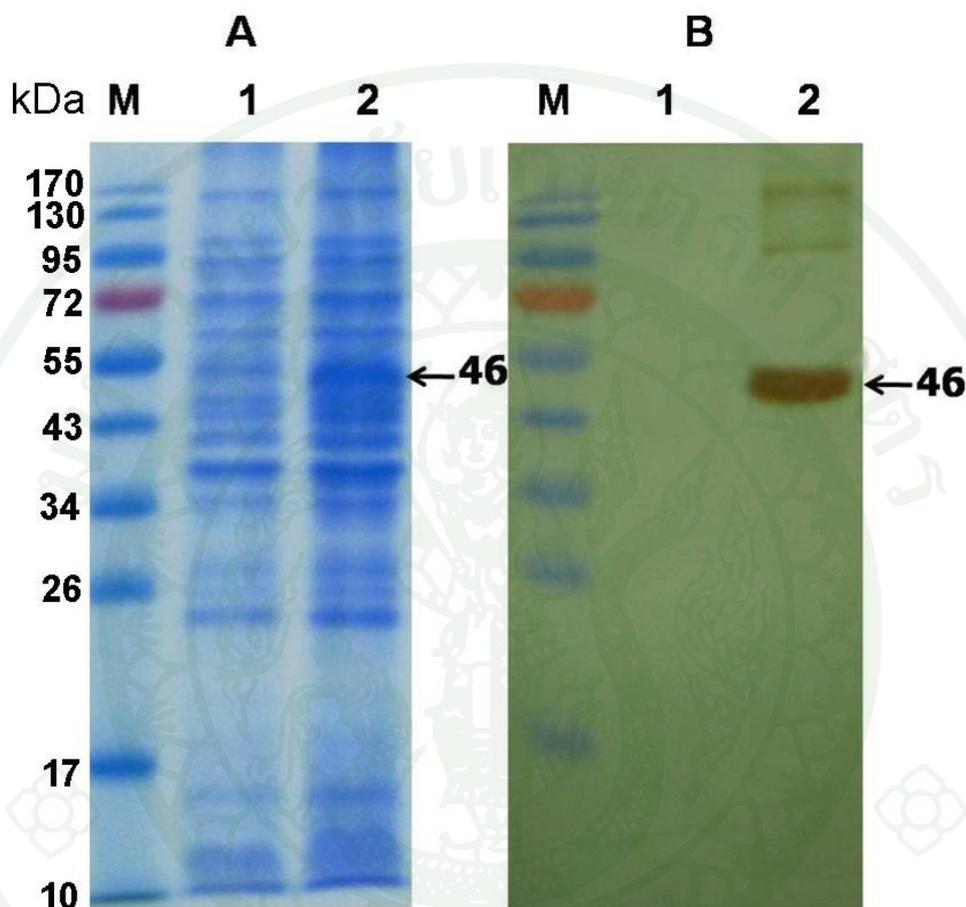
ภาพที่ 8 แสดงแถบดีเอ็นเอจากการทำ PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis, Lane M; 1kb DNA ladder (bp), lane N; negative control, lane P; positive control, lane 1-5; pET21a-CHK-E2-1, pET21a-CHK-E2-2, pET21a-CHK-E2-3, pET21a-CHK-E2-4 และ pET21a-CHK-E2-5 ตามลำดับใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS



ภาพที่ 9 แสดงแถบดีเอ็นเอจากการตัดพลาสมิด pET21a-CHK-E2 ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *NotI* ด้วย 1% agarose gel electrophoresis, Lane M; 1kb DNA ladder (bp), lane 1-5; pET21a-CHK-E2-1, pET21a-CHK-E2-2, pET21a-CHK-E2-3, pET21a-CHK-E2-4 และ pET21a-CHK-E2-5 ตามลำดับ ใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS

3. การผลิต rE2-protein

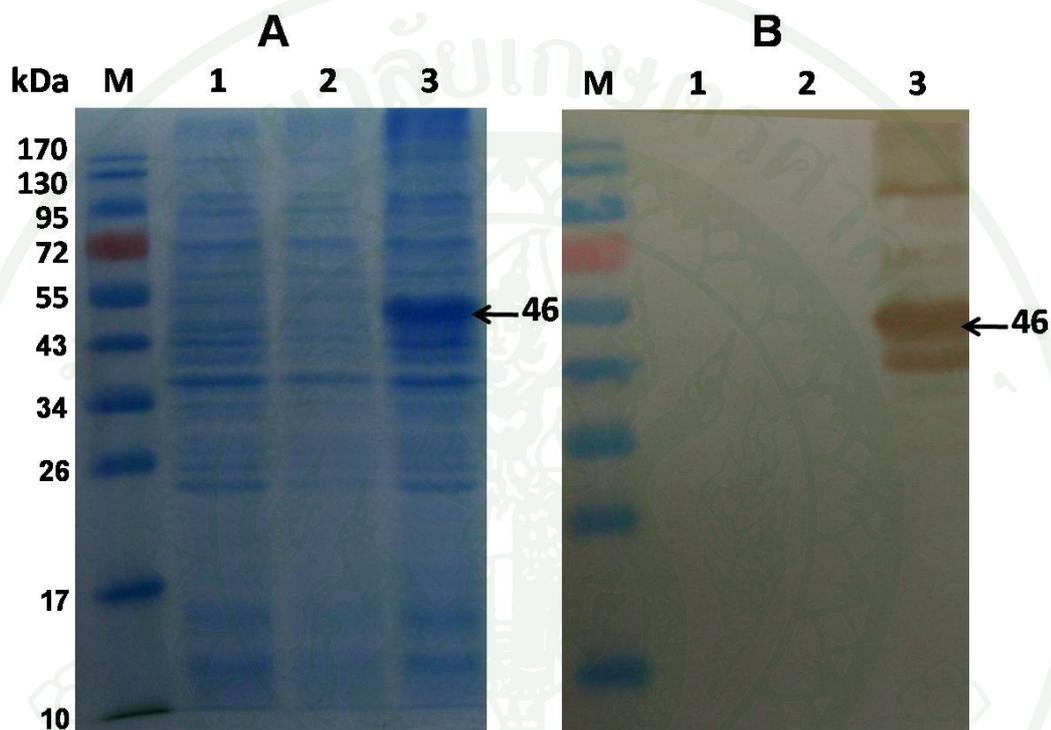
เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS ที่มีพลาสมิด pET21-CHK-E2 ในอาหาร LB broth ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin (100 µg/ml) ที่อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่งได้ค่า OD 600 nm เท่ากับ 0.6 หลังจากนั้นจึงเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนด้วย IPTG ความเข้มข้น 1.0 mM และนำไปเลี้ยงต่ออีก 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28°C เมื่อวิเคราะห์โปรตีนที่ได้จากการเหนี่ยวนำและไม่ได้เหนี่ยวนำด้วย IPTG โดยใช้ 15% SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R250 พบแถบโปรตีน ขนาดประมาณ 46 กิโลดาลตันเพิ่มขึ้นมาจากการเหนี่ยวนำการสร้าง rE2 protein ด้วย IPTG (ภาพที่ 10A) เมื่อตรวจสอบโปรตีนด้วยการทำ Western blot พบว่าโปรตีนขนาดประมาณ 46 กิโลดาลตันที่เพิ่มขึ้นมานั้นสามารถทำปฏิกิริยาที่จำเพาะกับ anti 5xHis antibody ทั้งนี้เนื่องจากพลาสมิด pET21a จะมีรหัสสำหรับสังเคราะห์กรดอะมิโน histidine 6 โมเลกุล (His-Tag) ต่อทางด้าน C-terminus ของ rE2 protein ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS ที่มีพลาสมิด pET21-CHK-E2 เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วย IPTG สามารถที่จะผลิต rE2 protein ได้ (ภาพที่ 10B)



ภาพที่ 10 แสดงแถบโปรตีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS ที่มีพลาสมิด pET21a-CHK-E2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้สร้าง rE2 protein ด้วย IPTG ความเข้มข้น 1.0 mM เปรียบเทียบกับ โปรตีนมาตรฐาน (A) โดยวิธี SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R250. lane M; protein molecular weight marker (kDa), lane 1; non induced protein, lane 2; induced protein. (B) โดยวิธี Western blot เมื่อเติม anti 5x His antibody. lane M; protein molecular weight marker (kDa), lane 1; non induced protein, lane 2; induced protein.

4. การตรวจสอบรูปแบบของ rE2-protein

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) pLysS ที่มีพลาสมิด pET21a-CHK-E2 โคลนที่ 1 (pET21a-CHK-E2 -1) ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้สร้างโปรตีนปริมาตร 1 ml/tube แล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นตัวแทนของ secreted protein ส่วนใส่ที่ได้จากการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี sonication เป็นตัวแทนของ soluble protein ส่วนตะกอนที่ได้เป็นตัวแทนของ insoluble protein (inclusion bodies) มาตรวจสอบว่า rE2 protein อยู่ในรูปแบบใด ด้วย 15% SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R250 พบแถบโปรตีนขนาด 46 กิโลดาลตัน เฉพาะส่วน ตะกอนเท่านั้น (ภาพที่ 11A) และเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Western blot โดยใช้ anti 5xHis antibody พบว่าแถบโปรตีนดังกล่าวสามารถทำปฏิกิริยากับ anti-5xHis antibody ได้ และโปรตีนในส่วนของ อาหารเลี้ยงเชื้อและส่วน ใส่ที่ได้จากการทำให้เซลล์แตกนั้น ไม่ทำปฏิกิริยากับ anti 5xHis antibody ดังนั้น จึงสรุปว่า rE2 protein อยู่ในรูปแบบ insoluble protein หรือ inclusion bodies (ภาพที่ 11B)



ภาพที่ 11 แสดงแถบโปรตีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS ที่มีพลาสมิด pET21a-CHK-E2 โคคลนที่ 1 (pET21a-CHK-E2-1) ที่เหนี่ยวนำให้สร้าง rE2 protein ด้วย IPTG ความเข้มข้น 1.0 mM เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (A) โดยวิธี SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R250. lane M; protein molecular weight marker (kDa), lane 1; soluble protein, lane 2; อาหารเลี้ยงเชื้อ, lane 3; insoluble protein. (B) โดยวิธี Western blot เมื่อเติม anti 5x His antibody. lane M; protein molecular weight marker (kDa), lane 1; soluble protein, lane 2; อาหารเลี้ยงเชื้อ, lane 3; insoluble protein.

5. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำการสร้าง rE2 protein

5.1 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีน rCHK-E2

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) pLysS ที่มีพลาสมิด pET21a-CHK-E2 โคลนที่ 1 (pET21a-CHK-E2 -1) ในอาหาร LB broth ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin (100 µg/ml) ที่อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่งได้ค่า OD 600 nm เท่ากับ 0.6 หลังจากนั้นจึงเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนด้วย IPTG ความเข้มข้น 1.0 mM และนำไปเลี้ยงต่อนาน 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C, 28°C และ 20°C เมื่อตรวจสอบการสังเคราะห์โปรตีนด้วย 15% SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R250 พบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 46 กิโลดาลตันทั้ง 3 อุณหภูมิ (ภาพที่ 12) และเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Western blot พบว่า แถบโปรตีนขนาดประมาณ 46 กิโลดาลตัน สามารถทำปฏิกิริยากับ anti 5xHis antibody ได้ (ภาพที่ 13) เมื่อทำการวัดปริมาณ โปรตีนด้วยวิธี Bradford (ภาคผนวก ข) พบว่าโปรตีนที่ได้จากการเหนี่ยวนำที่ 37°C มีความเข้มข้น 0.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โปรตีนที่ได้จากการเหนี่ยวนำที่ 28°C มีความเข้มข้น 0.30 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร และโปรตีนที่ได้จากการเหนี่ยวนำที่ 20°C มีความเข้มข้น 0.98 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 2) ดังนั้นจึงเลือกใช้อุณหภูมิที่ 20°C เป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการเหนี่ยวนำการสร้าง rE2 protein

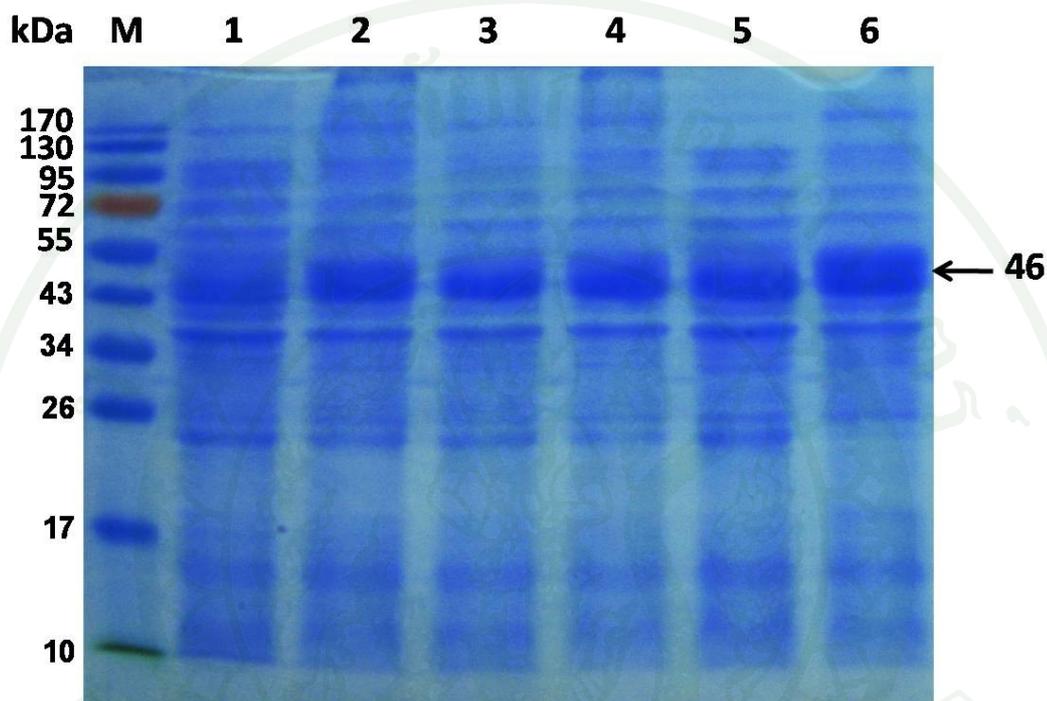
5.2 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ IPTG ในการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีน rCHK-E2

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) pLysS ที่มีพลาสมิด pET21a-CHK-E2 โคลนที่ 1 (pET21a-CHK-E2-1) ในอาหาร LB broth ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin (100 µg/ml) ที่อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่งได้ค่า OD 600 nm เท่ากับ 0.6 หลังจากนั้นจึงเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 0.0, 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.0 mM และนำไปเลี้ยง ต่อาน 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20°C เมื่อตรวจสอบการสังเคราะห์โปรตีนด้วย 15% SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R250 พบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 46 กิโลดาลตันทั้ง 4 ความเข้มข้น (ภาพที่ 14) และเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Western blot พบว่า แถบโปรตีนขนาดประมาณ 46 กิโลดาลตัน สามารถทำปฏิกิริยากับ anti 5xHis antibody ได้ (ภาพที่ 15) เมื่อทำการวัดปริมาณ โปรตีนด้วยวิธี Bradford (ภาคผนวก ข) พบว่าโปรตีนที่ไม่ได้เหนี่ยวนำด้วย

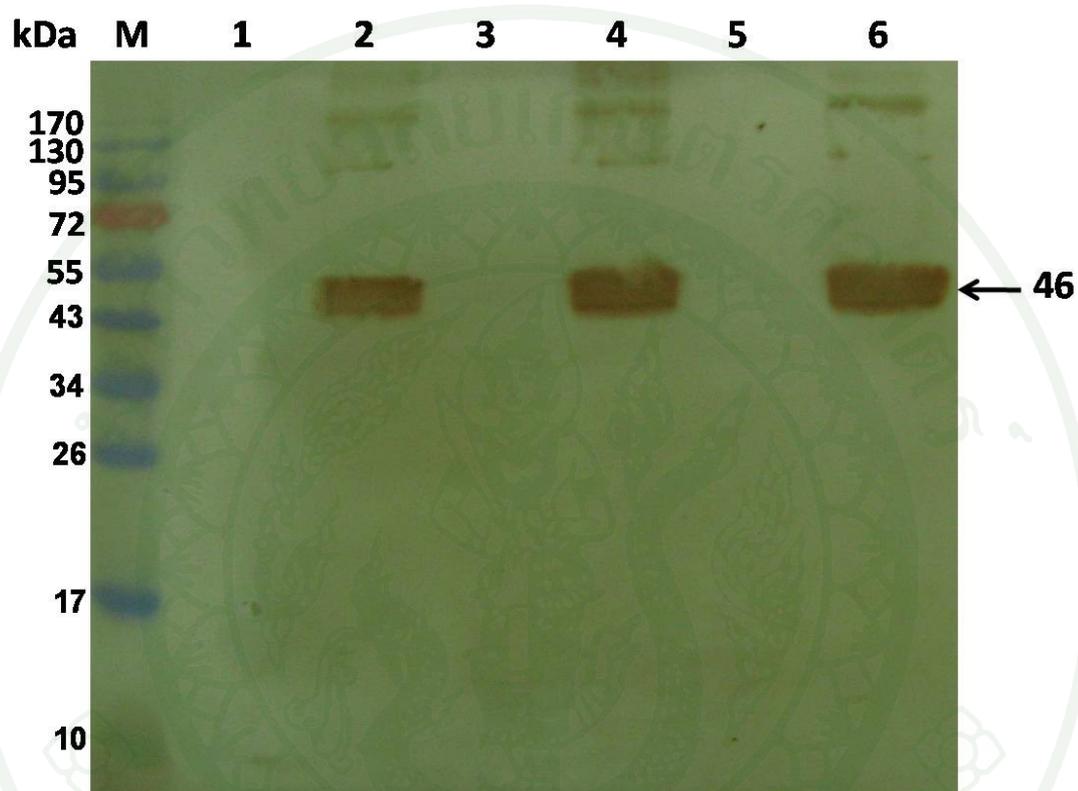
IPTG มีความเข้มข้น 0.183 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โปรตีนที่ได้จากการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 0.25 mM มีความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โปรตีนที่ได้จากการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 0.50 mM มีความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โปรตีนที่ได้จากการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 0.75 mM มีความเข้มข้น 0.95 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และโปรตีนที่ได้จากการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 1.0 mM มีความเข้มข้น 0.99 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3) ดังนั้นจึงเลือก IPTG ความเข้มข้น 0.50 mM เป็นความเข้มข้นที่ใช้ในการเหนี่ยวนำการสร้าง rE2 protein

5.3 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีน rCHK-E2

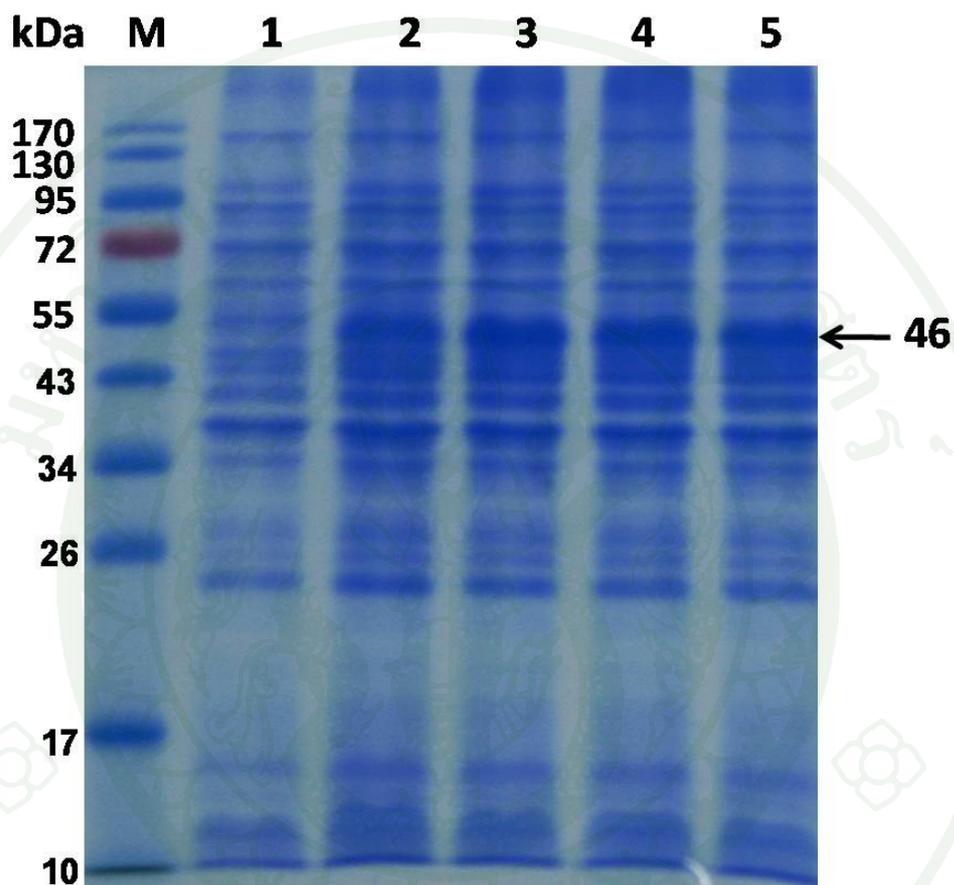
เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) pLysS ที่มีพลาสมิด pET21a-CHK-E2 โคลนที่ 1 (pET21a-CHK-E2 -1) ในอาหาร LB broth ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin (100 µg/ml) ที่อุณหภูมิ 37°C จนกระทั่งได้ค่า OD 600 nm เท่ากับ 0.6 หลังจากนั้นจึงเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.50 mM และนำไปเลี้ยงต่อนาน 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20°C แล้วเก็บตัวอย่างตอนเริ่มต้นเพาะเลี้ยงเป็นชั่วโมงที่ 0 (เมื่อเติม IPTG), 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบการสังเคราะห์โปรตีนด้วย 15% SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R250 พบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 46 กิโลดาลตันตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 หลังจากเติม IPTG แล้วเพาะเลี้ยงที่ 20°C (ภาพที่ 16) และเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Western blot พบว่า แถบ โปรตีนขนาดประมาณ 46 กิโลดาลตัน สามารถทำปฏิกิริยากับ anti 5xHis antibody ได้ (ภาพที่ 17) เมื่อทำการวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (ภาคผนวก ข) พบว่าโปรตีนที่ได้จากการเหนี่ยวนำ ที่ชั่วโมงที่ 0 มีความเข้มข้น 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 1 มีความเข้มข้น 0.34 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 2 มีความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 3 มีความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 4 มีความเข้มข้น 0.85 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และที่ ชั่วโมงที่ 5 มีความเข้มข้น 0.83 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4) ดังนั้นจึงเลือกใช้ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ การสร้าง rE2 protein ที่ 3 ชั่วโมง



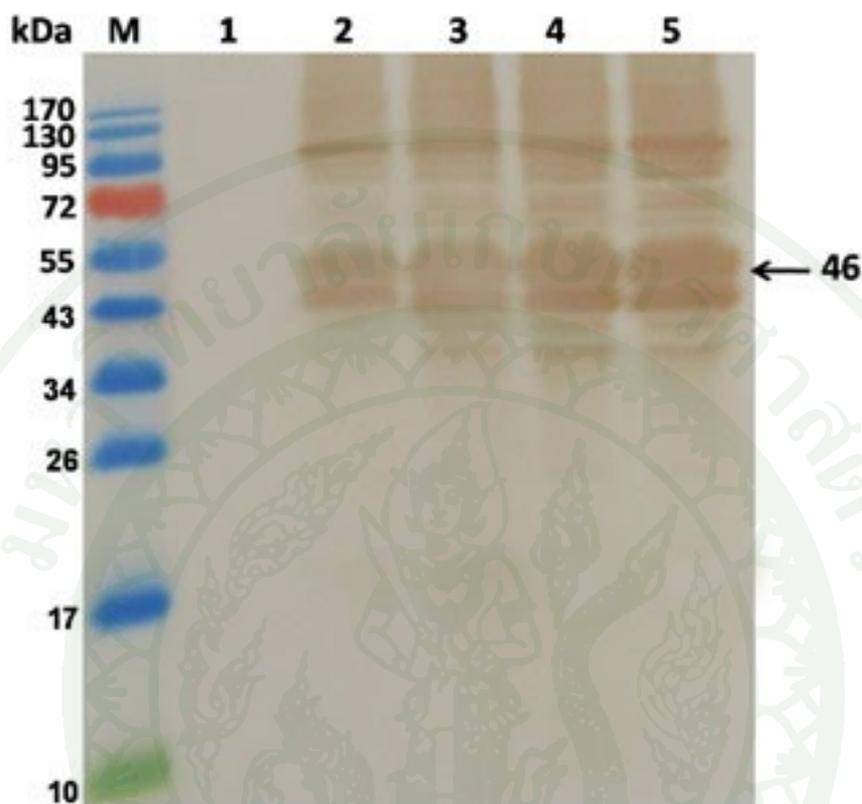
ภาพที่ 12 แสดงแถบโปรตีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS ที่มีพลาสมิด pET21a-CHK-E2 โคคลนที่ 1 (pET21a-CHK-E2 -1) ที่มีการเหนี่ยวนำการสร้าง rE2 protein ที่อุณหภูมิ 37 °C, 28 °C และ 20 °C และ IPTG ความเข้มข้น 1.0 mM เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R250, lane M; protein molecular weight marker (kDa), lane 1; non induced protein ที่ 37 °C , lane 2; induced protein 37 °C, lane 3; non induced protein ที่ 28 °C, lane 4; induced protein ที่ 28 °C, lane 5; non induced protein ที่ 20 °C, lane 6; induced protein ที่ 20 °C.



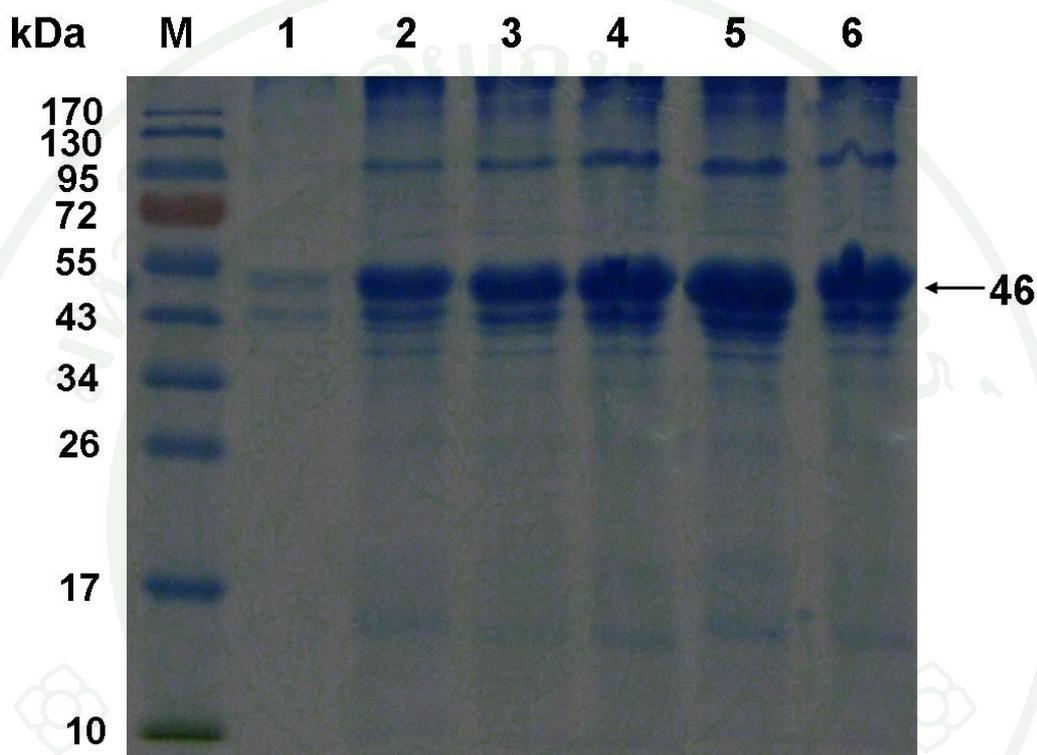
ภาพที่ 13 แสดงผลการศึกษาความจำเพาะของ rE2 protein กับ anti 5xHis antibody โดยวิธี Western blot. lane M; protein molecular weight marker (kDa), lane 1; non induced protein ที่ 37°C, lane 2; induced protein 37 °C, lane 3; non induced protein ที่ 28 °C, lane 4; induced protein ที่ 28°C, lane 5; non induced protein ที่ 20 °C, lane 6; induced protein ที่ 20 °C.



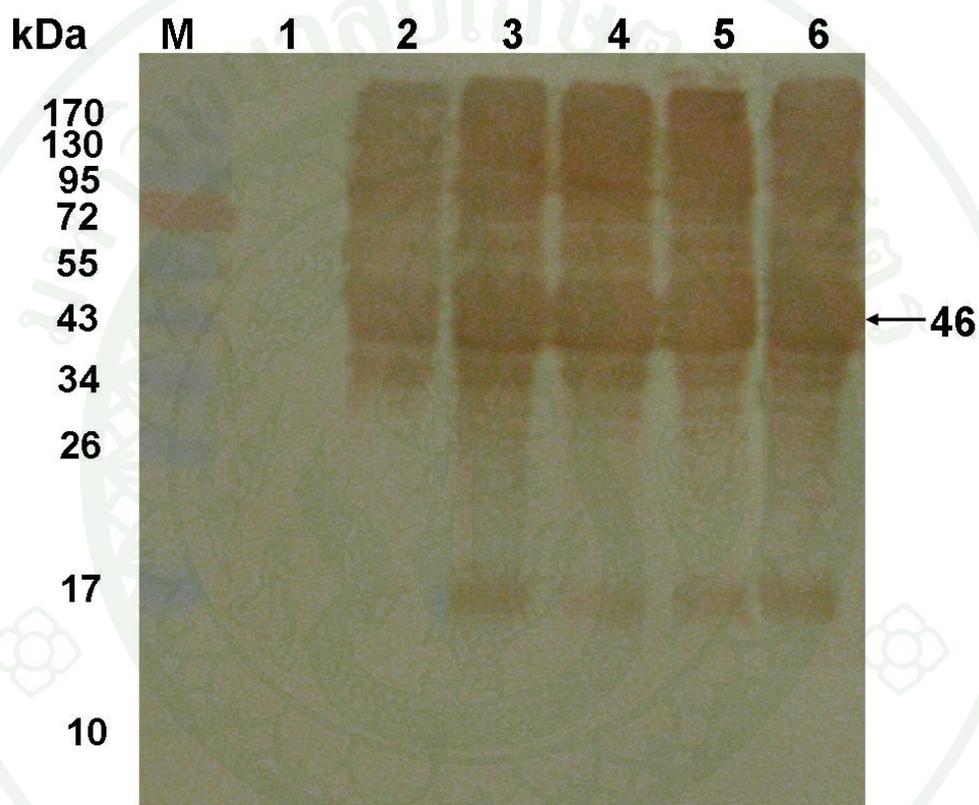
ภาพที่ 14 แสดงแถบโปรตีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS ที่มีพลาสมิด pET21a-CHK-E2 ที่มีการเหนี่ยวนำการสร้าง rE2 protein ที่อุณหภูมิ 20 °C และ IPTG ความเข้มข้น 0.0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 mM เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R250, lane M; protein molecular weight marker (kDa), lane 1; IPTG 0.0 mM, lane 2; IPTG 0.25 mM, lane 3; IPTG 0.5 mM, lane 4; IPTG 0.75 mM, lane 5; IPTG 1.0 mM.



ภาพที่ 15 แสดงผลการศึกษาความจำเพาะของ rE2 protein ที่ได้จากการเหนี่ยวนำการสร้าง rE2 protein ที่อุณหภูมิ 20°C และ IPTG ความเข้มข้น 0.0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 mM กับ anti 5xHis antibody โดยวิธี Western blot. lane M; protein molecular weight marker (kDa), lane 1; IPTG 0.0 mM, lane 2; IPTG 0.25 mM, lane 3; IPTG 0.5 mM, lane 4; IPTG 0.75 mM., lane 5; IPTG 1.0 mM.



ภาพที่ 16 แสดงแถบโปรตีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS ที่มีพลาสมิด pET21a-CHK-E2 ที่มีการเหนี่ยวนำการสร้าง rE2 protein ที่อุณหภูมิ 20 °C และ IPTG ความเข้มข้น 0.5 mM โดยเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 หลังเติม IPTG เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R250, lane M; protein molecular weight marker (kDa), lane 1; ชั่วโมงที่ 0, lane 2; ชั่วโมงที่ 1, lane 3; ชั่วโมงที่ 2, lane 4; ชั่วโมงที่ 3, lane 5; ชั่วโมงที่ 4, lane 6; ชั่วโมงที่ 5.



ภาพที่ 17 แสดงผลการศึกษาความจำเพาะของ rE2 protein ที่ได้จากการการเหนี่ยวนำการสร้า rE2 protein ที่อุณหภูมิ 20°C และ IPTG ความเข้มข้น 0.5 mM โดยเก็บตัวอย่างชั่วโมง ที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 หลังเติม IPTG กับ anti 5xHis antibody โดยวิธี Western blot. lane M; protein molecular weight marker (kDa), lane 1; ชั่วโมงที่ 0, lane 2; ชั่วโมงที่ 1, lane 3; ชั่วโมงที่ 2, lane 4; ชั่วโมงที่ 3, lane 5; ชั่วโมงที่ 4, lane 6; ชั่วโมงที่ 5.

ตารางที่ 2 แสดงค่า OD ที่ 595 nm และความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน (Total protein) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS ที่มี พลาสมิด pET21a-CHK-E2 ที่มีการเหนี่ยวนำการสร้าง rE2 protein ที่อุณหภูมิ 37°C, 28°C และ 20°C และ IPTG ความเข้มข้น 1.0 mM

อุณหภูมิที่ทำการเหนี่ยวนำ (°C)	OD 595 nm	ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน (mg/ml)
37°C	0.097	0.18
28°C	0.132	0.30
20°C	0.336	0.98

หมายเหตุ ทำการเจือจางสารละลายโปรตีนที่อัตราการเจือจาง 1:100

ตารางที่ 3 แสดงค่า OD ที่ 595 nm และความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน (Total protein) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS ที่มี พลาสมิด pET21a-CHK-E2 ที่มีการเหนี่ยวนำการสร้าง rE2 protein ที่อุณหภูมิ 20 °C และ IPTG ความเข้มข้น 0.0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 mM

ความเข้มข้นของ IPTG ที่ทำการเหนี่ยวนำ (mM)	OD 595 nm	ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน (mg/ml)
0.0	0.097	0.18
0.25	0.222	0.6
0.50	0.347	1.0
0.75	0.327	0.95
1.00	0.339	0.99

หมายเหตุ ทำการเจือจางสารละลายโปรตีนที่อัตราการเจือจาง 1:100

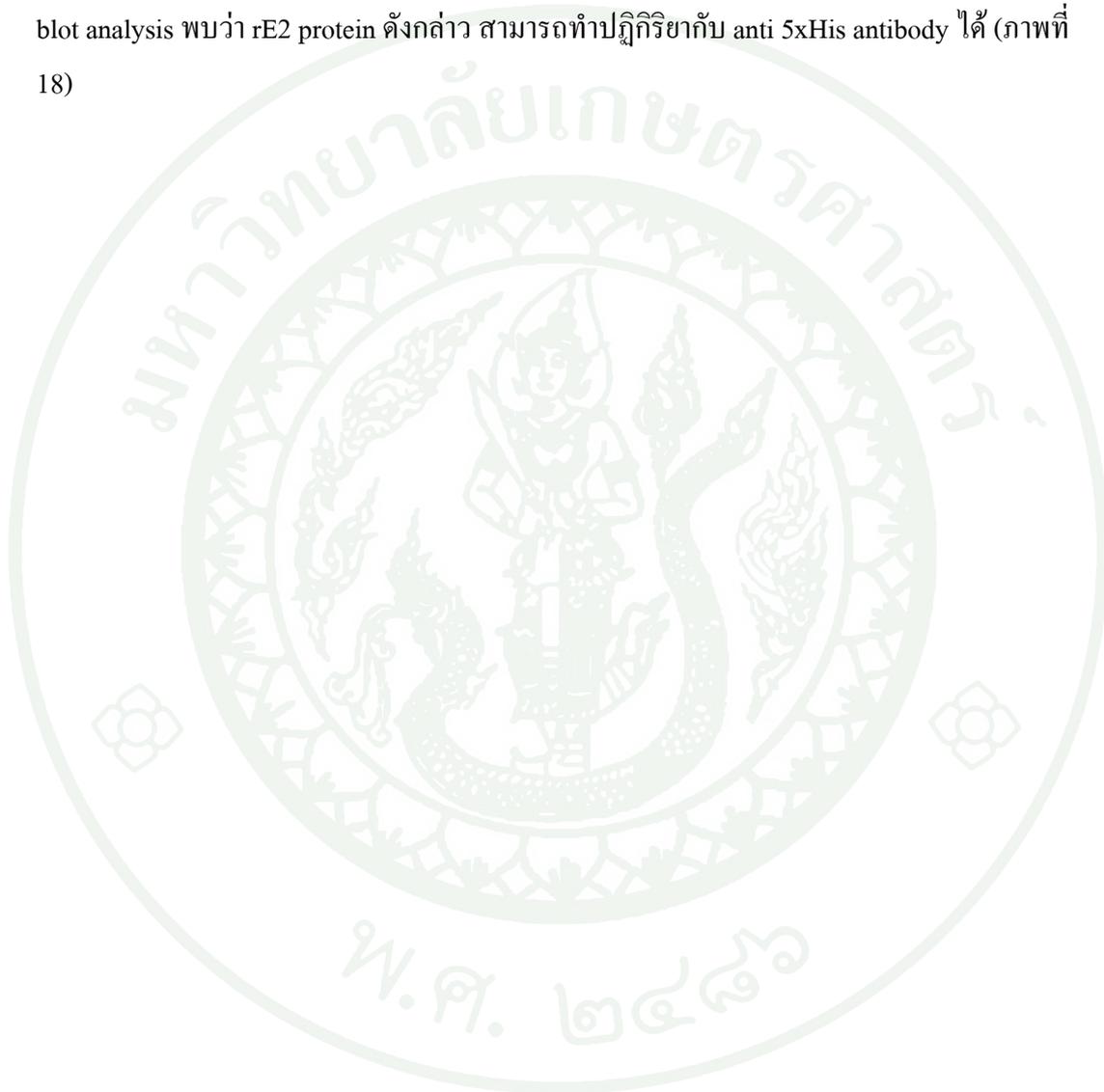
ตารางที่ 4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm และความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน (Total protein) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) pLysS ที่มี พลาสมิด pET21a-CHK-E2 ที่มีการเหนี่ยวนำการสร้าง rE2 protein ที่อุณหภูมิ 20°C และ IPTG ความเข้มข้น 0.5 mM โดยเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5

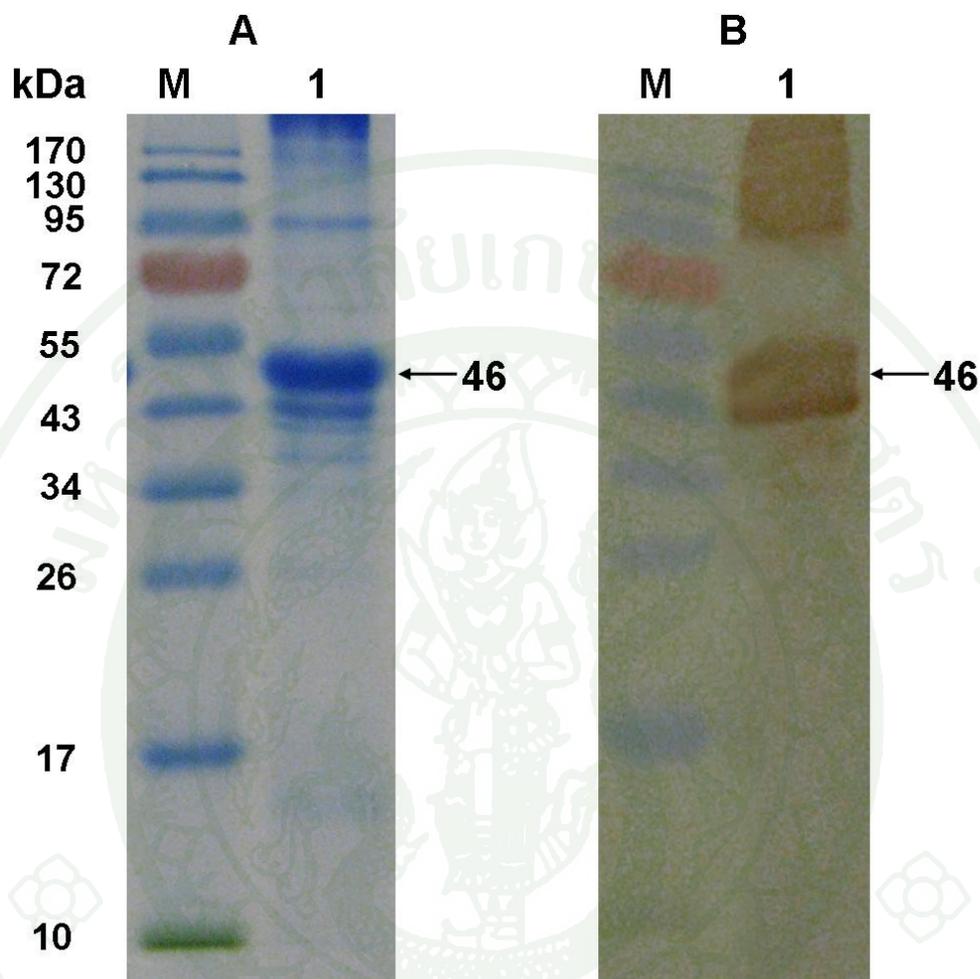
ชั่วโมงหลังเติม IPTG	OD 595 nm	ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน (mg/ml)
0	0.100	0.19
1	0.144	0.34
2	0.222	0.6
3	0.282	0.8
4	0.297	0.85
5	0.290	0.83

หมายเหตุ ทำการเจือจางสารละลายโปรตีนที่อัตราเจือจาง 1:100

6. การสกัดแยก rE2-protein

นำโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วย 1x IB solubilized buffer มาตรวจสอบ rE2 protein มีความเข้มข้น 0.85 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย 15% SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R250 พบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 46 กิโลดาลตัน ซึ่งมีโปรตีนอื่นๆเพียงเล็กน้อย และเมื่อทำ Western blot analysis พบว่า rE2 protein ดังกล่าว สามารถทำปฏิกิริยากับ anti 5xHis antibody ได้ (ภาพที่ 18)



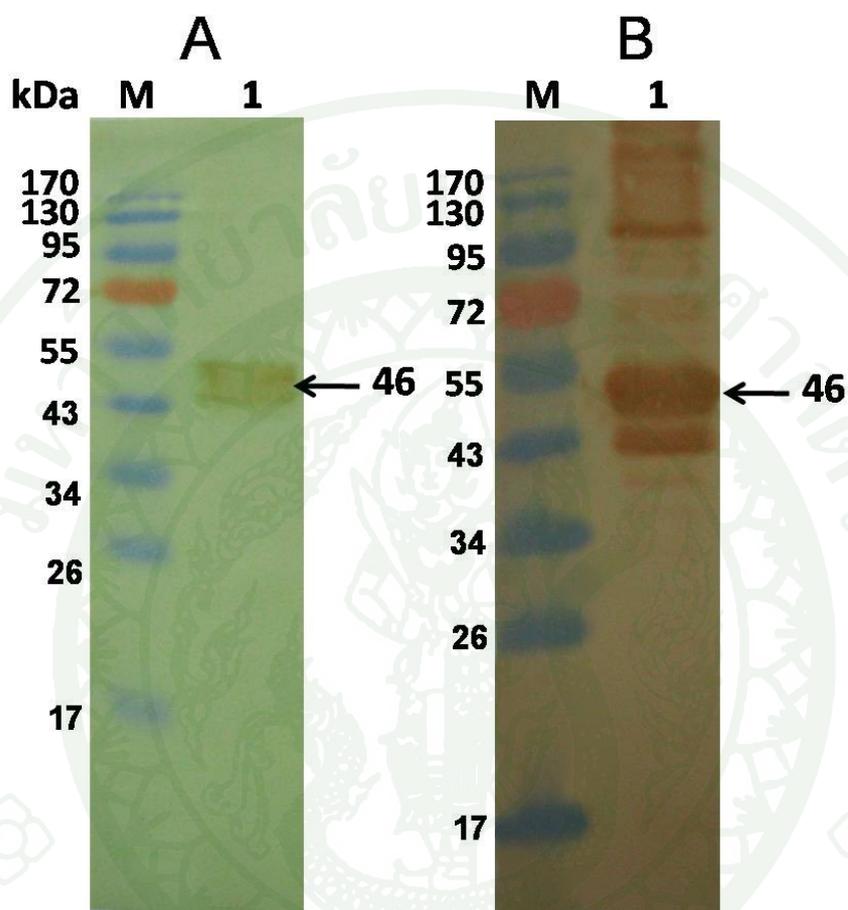


ภาพที่ 18 แสดงแถบโปรตีน rE2 protein ที่สกัดโดยใช้ 0.5% N-laurylsarcosine เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (A) โดยวิธี SDS-PAGE และย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R250. lane M; protein molecular weight marker (kDa), lane 1; rE2protein, (B) โดยวิธี Western blot เมื่อเติม anti 5xHis antibody. lane M; protein molecular weight marker (kDa), lane 1; rE2protein.

7. การทำ Western blot analysis

ผลจาก Western blot analysis พบว่า rE2 protein ที่สกัดโดยใช้ 0.5% N-laurylsarcosine สามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้งกับ anti 5xHis antibody ที่เจือจางด้วย blocking buffer อัตราส่วน 1:1000 (ภาพที่ 19A) และแอนติบอดีในตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคไข้วอดข้อที่เจือจางด้วย blocking buffer อัตราส่วน 1:50 (ภาพที่ 19B)

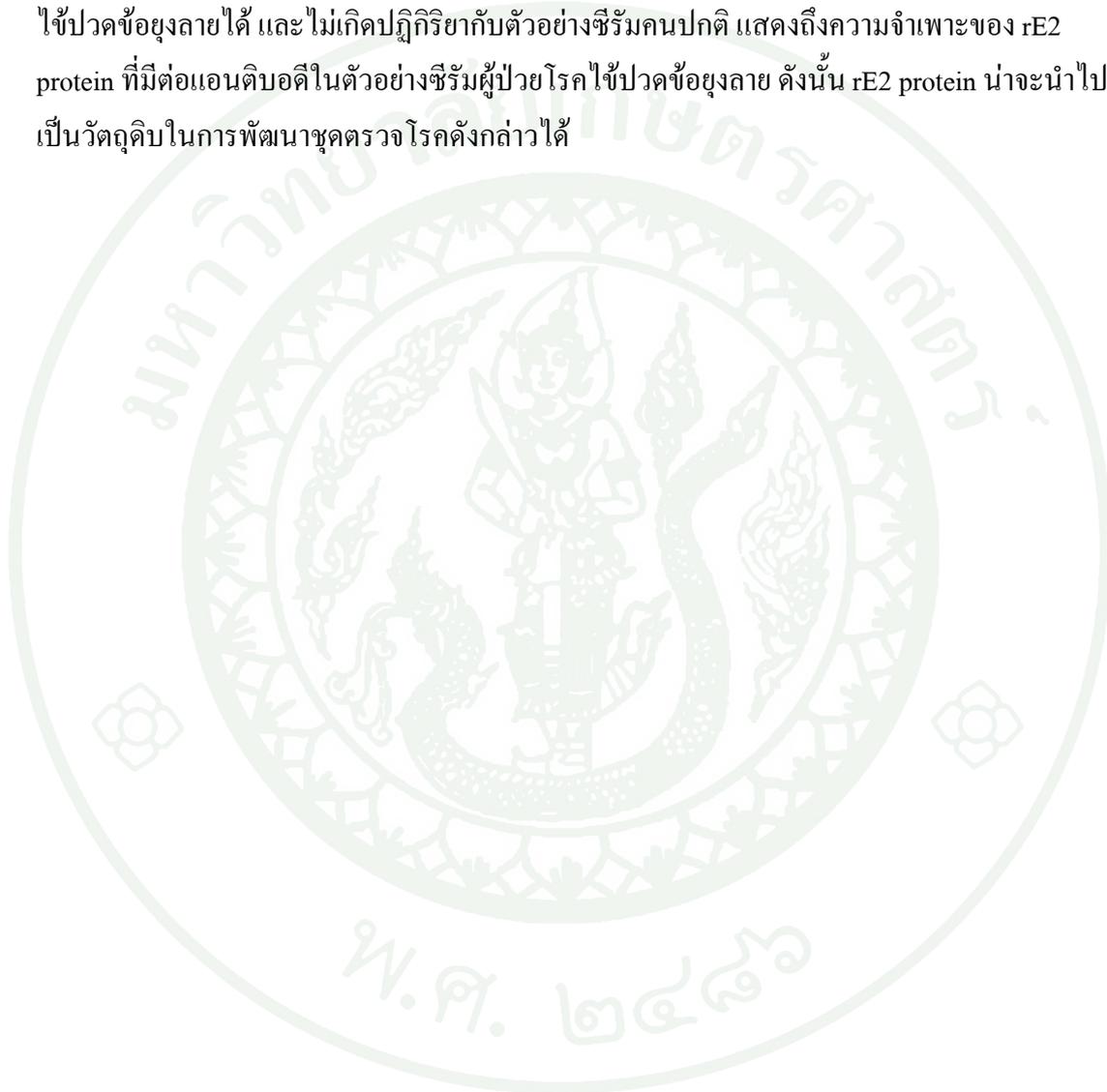
การที่ rE2 protein สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคไข้วอดข้อ ยุงลายได้ แสดงถึงความจำเพาะของ rE2 protein ซึ่งอาจนำไปเป็นวัตถุดิบ ในการพัฒนาชุดตรวจ โรคไข้วอดข้อยุงลายได้

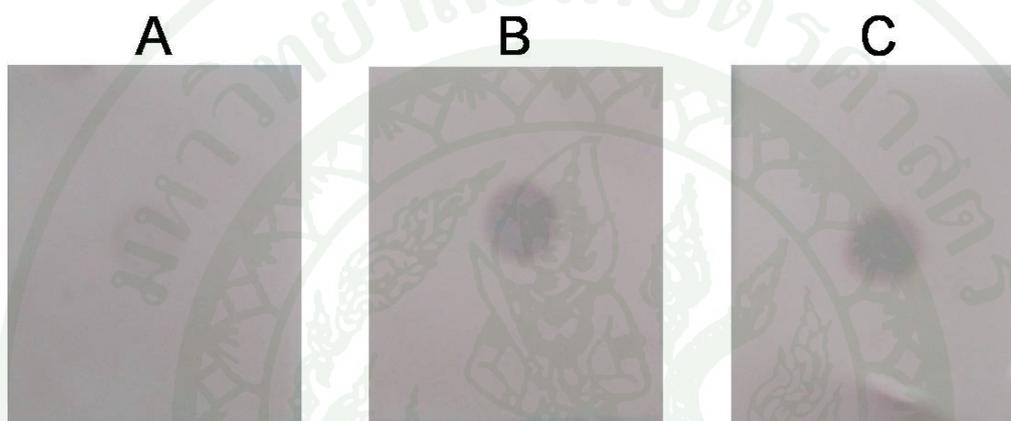


ภาพที่ 19 แสดงผล Western blot ของ rE2 protein ที่สกัดโดยใช้ 0.5% N-laurylsarcosine (A) โดยใช้ anti 5xHis antibody เจือจาง 1:1000. lane M; protein molecular weight marker (kDa), lane 1; rE2protein, (B) โดยใช้ตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคไข้วัดข้อยุบตาย เจือจาง 1:50. lane M; protein molecular weight marker (kDa), lane 1; rE2protein.

8. การทำ dot blot

จากการทำ dot blot โดยใช้ rE2 protein ปริมาณ 2 ไมโครกรัม ทำปฏิกิริยากับตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคไข้วอดข้อยุงลายที่ทำการเจือจาง 1:10 และ 1:50 (ภาพที่ 20B และ 20C) และตัวอย่างซีรัมคนปกติที่ทำการเจือจาง 1:10 (ภาพที่ 20A) พบว่า rE2 protein สามารถทำปฏิกิริยากับซีรัมผู้ป่วยโรคไข้วอดข้อยุงลายได้ และไม่เกิดปฏิกิริยากับตัวอย่างซีรัมคนปกติ แสดงถึงความจำเพาะของ rE2 protein ที่มีต่อแอนติบอดีในตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคไข้วอดข้อยุงลาย ดังนั้น rE2 protein น่าจะนำไปเป็นวัสดุคิบัในการพัฒนาชุดตรวจโรคดังกล่าวได้





ภาพที่ 20 แสดงผล dot blot ระหว่าง rE2 protein ปริมาณ 2 ไมโครกรัม กับตัวอย่างซีรัม (A) ตัวอย่างซีรัมคนปกติที่เจือจาง 1:10, (B) ตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคไข้วัดข้อยุลงลายที่เจือจาง 1:10, (C) ตัวอย่างซีรัมคนปกติ 1:50.

9. การตรวจตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคไข้วัดข้อยุลงลายด้วยชุดตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสซิกุนกุนยาชนิด IC

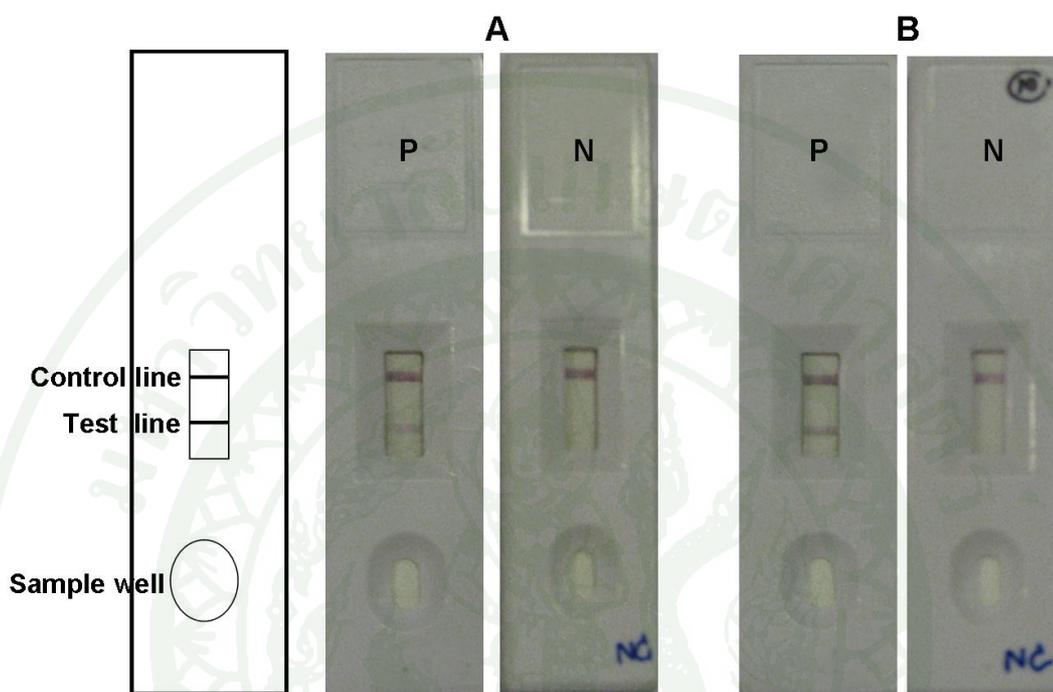
ผลการตรวจตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคไข้วัดข้อยุลงลายด้วยชุดตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสซิกุนกุนยาด้วยวิธี IC นั้น พบว่าทั้ง sample buffer สูตรที่ 1 และสูตรที่ 2 แสดงแถบ control line และ test line ที่ชัดเจน แต่เมื่อทำการตรวจตัวอย่างซีรัมคนปกติ พบว่ายังคงแสดงแถบ test line อยู่

เมื่อทำการทดสอบตัวอย่างซีรัมด้วย sample buffer สูตรที่ 3 และสูตรที่ 4 ที่เติม 1% NaCl พบว่าทั้ง sample buffer สูตรที่ 3 และสูตรที่ 4 ยังคงแสดงแถบ control line และ test line ยังคงชัดเจน ทั้งในส่วน of ตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยและตัวอย่างซีรัมคนปกติ แต่พบว่าระยะเวลาที่แสดงสีของแถบ control line และ test line ลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก การเติม 1% NaCl ช่วยให้การเคลื่อนที่ของตัวอย่างดีขึ้น โดย NaCl เมื่อแตกตัวในสารละลายทำให้เกิดประจุบวกและประจุลบ ช่วยให้การเคลื่อนที่ของตัวอย่างดีขึ้น (ภาพที่ 21A และ 21B)

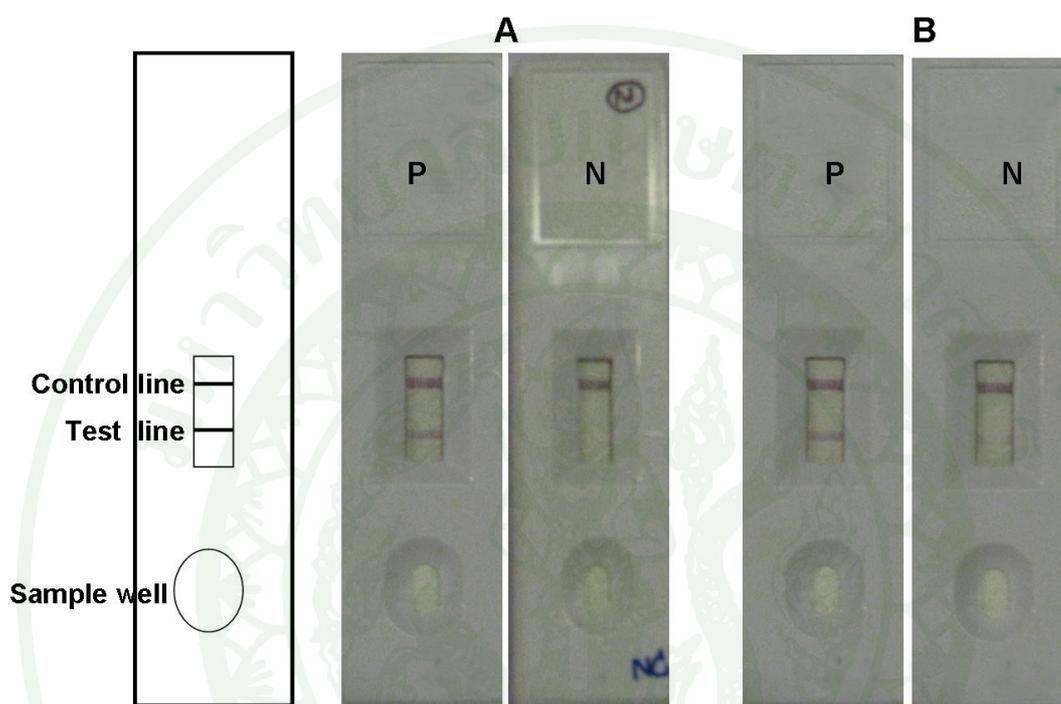
เมื่อทำการทดสอบตัวอย่างซีรัมด้วย sample buffer สูตรที่ 5 และสูตรที่ 6 ที่เติม 1% BSA พบว่าทั้ง sample buffer สูตรที่ 5 และสูตรที่ 6 แสดงแถบ control line และ test line ที่ชัดเจนเพิ่มขึ้น ทั้งในส่วน of ตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยและตัวอย่างซีรัมคนปกติ อาจเนื่องมาจาก BSA ที่เติมลงไปนั้นทำให้โมเลกุลของแอนติบอดีและแอนติเจนอยู่ใกล้มากยิ่งขึ้น จึงเป็นการเพิ่มโอกาสในการจับกันระหว่างโมเลกุลทั้ง 2 จึงทำให้ได้แถบ control line และ test line ที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น (ภาพที่ 22A และ 22B)

เมื่อทำการทดสอบตัวอย่างซีรัมด้วย sample buffer สูตรที่ 7 และสูตรที่ 8 ที่เติม 1% sucrose พบว่า sample buffer ทั้ง 2 สูตรยังแสดงแถบ control line ที่ชัดเจน ทั้งในตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยและตัวอย่างซีรัมคนปกติ แต่พบว่า sample buffer สูตรที่ 7 เมื่อตรวจตัวอย่างซีรัมคนปกติ ให้แถบ test line ที่จางลง ส่วนสูตรที่ 8 ยังให้แถบ test line ที่ชัดเจน แสดงให้เห็นว่า sample buffer สูตรที่ 7 น่าจะมีความเหมาะสมในการเจือจางตัวอย่างซีรัมเพราะสามารถแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยและตัวอย่างซีรัมคนปกติได้ (ภาพที่ 23A และ 23B)

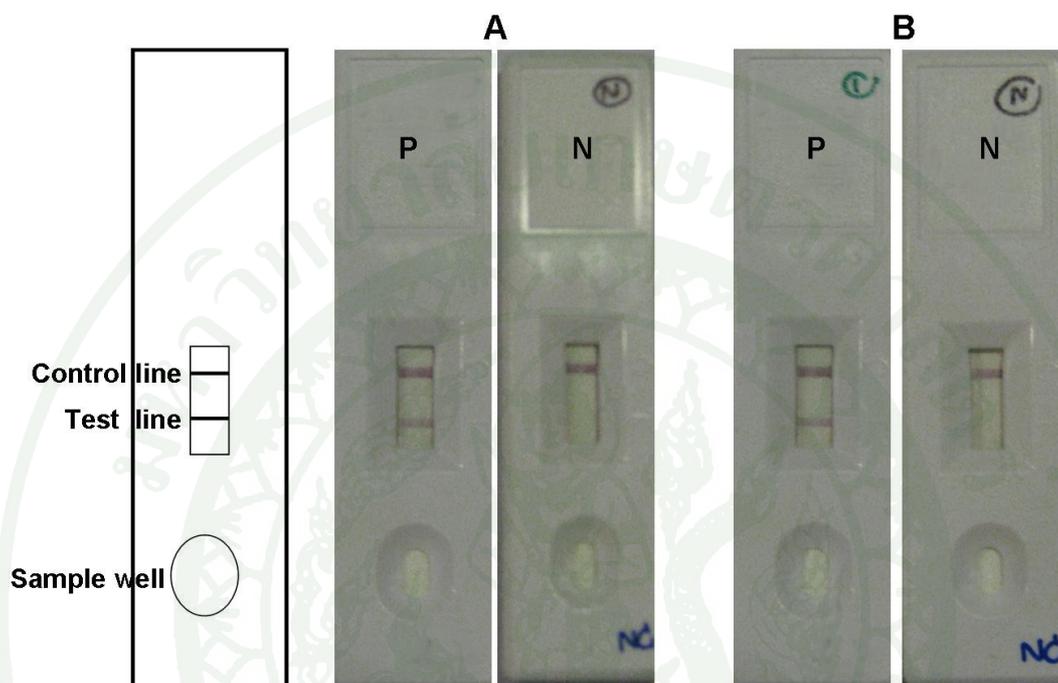
ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงได้เลือก sample buffer สูตรที่ 7 (10 mM PB, 0.1%NaN₃, 0.1% 4 aminoantipyrine, 0.1% Tween 20, 1% sucrose) มาใช้ในการเจือจางตัวอย่างซีรัมสำหรับชุดตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสซิกุนกุนยาด้วยวิธี IC



ภาพที่ 21 แสดงผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสชิคุนกุนยาด้วยวิธี IC โดย (A) sample buffer สูตรที่ 3; P; ตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคไข้ปวดข้อยุงลาย, N; ตัวอย่างซีรัมคนปกติ, (B) sample buffer สูตรที่ 4; P; ตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคไข้ปวดข้อยุงลาย, N; ตัวอย่างซีรัมคนปกติ



ภาพที่ 22 แสดงผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสซิกุนกุนยาด้วยวิธี IC โดย (A) sample buffer สูตรที่ 5. P; ตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคไข้วัดซ้อยงลาย, N; ตัวอย่างซีรัมคนปกติ, (B) sample buffer สูตรที่ 6. P; ตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคไข้วัดซ้อยงลาย, N; ตัวอย่างซีรัมคนปกติ



ภาพที่ 23 แสดงผลการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสชิคุนกุนยาด้วยวิธี IC โดย (A) sample buffer สูตรที่ 7. P; ตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคไข้ปวดข้อยุงลาย, N; ตัวอย่างซีรัมคนปกติ, (B) sample buffer สูตรที่ 8. P; ตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคไข้ปวดข้อยุงลาย, N; ตัวอย่างซีรัมคนปกติ

สรุปและข้อเสนอแนะ

เมื่อตรวจสอบขนาดของยีน *E2* ที่ได้จากการทำ one step RT-PCR พบว่ามีขนาดประมาณ 1280 bp โดยยีน *E2* ของไวรัสชิคุนกุนยาสายพันธุ์ Ross มีขนาด 1266 bp ขนาดของยีนที่เพิ่มจาก 1260 bp เป็น 1280 bp เนื่องมาจากยีน *E2* ที่ได้จากการทำ PCR ได้รวมส่วนของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (GAATTC) ซึ่งมี 6 bp และ *NotI* (GCGGCCCG) ซึ่งมี 8 bp ทำให้ยีน *E2* ที่ได้จากการทำ PCR มีขนาดประมาณ 1280 bp

เมื่อนำยีน *E2* จากรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEMT-CHK-E2 ไป blast กับฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) พบว่าคล้ายกับยีน *E2* ของไวรัส ชิคุนกุนยา สายพันธุ์ Ross โดยมีค่า Max identity ที่ 99 เปอร์เซ็นต์ (1266 bp) เช่นเดียวกันกับลำดับกรดอะมิโนก็คล้ายกับกรดอะมิโนของโปรตีน *E2* ของไวรัสชิคุนกุนยา สายพันธุ์ Ross โดยมีค่า identity ที่ 99 เปอร์เซ็นต์ (422 กรดอะมิโน) (ภาคผนวก ง)

rE2 protein ของไวรัสชิคุนกุนยา (CHKV) ที่ผลิตใน *E. coli* มีขนาดประมาณ 46 กิโลดาลตัน มีค่าใกล้เคียงกับ rE2 protein ของไวรัสชิคุนกุนยา (CHKV) ที่ผลิตใน *E. coli* มีขนาดประมาณ 44 กิโลดาลตัน (Ranadive and Banerjee, 1990) และมีขนาดใกล้เคียงกับ rE2 protein ที่ทำการผลิตในระบบ Baculovirus ที่มีขนาดประมาณ 40 กิโลดาลตัน (Cho, *et al.*, 2008) โปรตีน *E2* ที่สกัดจากอนุภาคของไวรัสชิคุนกุนยา จะมีมีขนาดประมาณ 47.5 กิโลดาลตัน (Bréhin, *et al.*, 2008) การที่ rE2 protein มีขนาดแตกต่างกันนั้นน่าจะมาจากสายพันธุ์ของไวรัสชิคุนกุนยาและการเลือกเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการผลิตโปรตีนดังกล่าว เมื่อเปรียบเทียบขนาดของโปรตีนที่ผลิตในระบบ *E. coli* เหมือนกันแต่มีขนาดแตกต่างกันนั้น เนื่องจาก rE2 protein ได้รวมส่วนของกรดอะมิโนฮิสทีดีน อีก 6 โมเลกุลเพิ่มเข้าไป

งานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเหนี่ยวนำการผลิต rE2 protein ใน *E. coli* พบว่าการเหนี่ยวนำการผลิตโปรตีนที่อุณหภูมิ 20°C เหมาะสมที่สุด เพราะให้ค่าโปรตีนรวมสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการเหนี่ยวนำการผลิต rE2 protein ที่อุณหภูมิ 37°C และ 28°C ทั้งนี้เนื่องมาจากอุณหภูมิที่ 37°C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อ *E. coli* โดยเชื้อจะใช้พลังงานและสารอาหารเพื่อแบ่งเซลล์สำหรับการเจริญจึงทำให้ผลิตโปรตีนส่วนอื่น ๆ น้อยลง เมื่อลด

อุณหภูมิเป็น 20°C ซึ่งไม่ใช่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อ ทำให้เชื้อ *E. coli* นำพลังงานและสารอาหารมาใช้สำหรับการผลิตโปรตีนอื่นๆแทน โปรตีนที่ใช้สำหรับการแบ่งเซลล์ นอกจากนี้การเหนี่ยวนำการผลิตโปรตีนที่อุณหภูมิต่ำยังรักษาความเสถียรของโปรตีนได้อีกด้วย (Jones, *et al.*, 1987)

งานวิจัยครั้งนี้ได้เลือกใช้ การเหนี่ยวนำการผลิต rE2 protein ด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 0.50 mM การที่ IPTG สามารถเหนี่ยวนำการผลิตโปรตีนได้นั้น เนื่องจาก IPTG เป็นสารเคมีที่มีโครงสร้างคล้าย allolactose ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์ β -galactosidase โดยเอนไซม์นี้จะถูกผลิตจากยีน *lac Z* ซึ่งมีอยู่บนตำแหน่ง cloning site ของพลาสมิด pET21a แต่เอนไซม์นี้ไม่สามารถย่อย IPTG ได้ ดังนั้นจึงมี IPTG ตลอดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง transformant (Hansen, *et al.*, 1998) ดังนั้นแม้ว่าจะใช้ปริมาณน้อยก็สามารถอยู่ในอาหารตลอดระยะเวลาที่ใช้ในการเหนี่ยวนำการผลิตโปรตีน จากผลการทดลองพบว่า transformant ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET21a-CHK-E2 สามารถผลิตโปรตีน rE2 protein ได้แม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นของ IPTG เพียง 0.25 mM แต่เมื่อเปรียบเทียบค่าโปรตีนรวมแล้วพบว่าการใช้ IPTG ความเข้มข้น 0.5 mM 0.75 mM และ 1 mM ให้ค่าโปรตีนรวมที่ไม่แตกต่างกันมากนัก โดยโปรตีนที่ได้จากการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 0.50 mM มีความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โปรตีนที่ได้จากการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 0.75 mM มีความเข้มข้น 0.95 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และโปรตีนที่ได้จากการเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 1.0 mM มีความเข้มข้น 0.99 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3) ดังนั้นจึงเลือก IPTG ความเข้มข้น 0.50 mM เป็นความเข้มข้นที่ใช้ในการเหนี่ยวนำการสร้าง rE2 protein

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมที่ใช้เหนี่ยวนำการผลิต rE2 protein นั้น พบว่าตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 หลังจากเติม IPTG ที่ความเข้มข้น 0.5 mM transformant ก็เริ่มผลิต rE2 protein แต่เมื่อเปรียบเทียบโปรตีนรวมแล้วพบว่าให้ค่าไม่แตกต่างกันมากนักตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 ชั่วโมงที่ 4 และชั่วโมงที่ 5 ดังนั้นจึงเลือกใช้ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำการผลิตโปรตีนที่ 3 ชั่วโมง

จากการทำ Western blot และ dot blot พบว่า rE2 protein สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคไข้วอดข้อยุลงลาย แสดงให้เห็นถึงศักยภาพที่จะนำไปเป็นวัตถุคิบบสำหรับพัฒนาเป็นชุดทดสอบ โดยงานวิจัยครั้งนี้ได้ทดลองนำโปรตีน E2 ไปศึกษาการพัฒนาชุดทดสอบชนิด immunochromatography หรือ IC เพื่อตรวจหาแอนติบอดีในผู้ป่วยโรคไข้วอดข้อยุลงลาย พบว่า rE2 protein ให้ผลการทดลองที่น่าสนใจ คือ สามารถที่จะแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างซีรัมผู้ติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาและตัวอย่างซีรัมคนปกติได้ โดยสูตร

sample buffer ที่เหมาะสมสำหรับการเจือจางตัวอย่างซีรัม คือ สูตรที่ 7 (10 mM PB, 0.1%NaN₃, 0.1% 4 aminoantipyrine, 0.1% Tween 20, 1% sucrose)

ปัจจุบันมีการพัฒนาชุดตรวจโรคไข้วัดข้อยุลงลายด้วยวิธี IC โดยการตรวจหา IgM ในตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคไข้วัดข้อยุลงลาย เช่น One Step IgM antibodies to Chikungunya virus Test (SD BIOLINE, Kyonggido, Korea) ซึ่งเป็นชุดตรวจที่อาศัยหลักการ solid phase immunochromatographic พบว่าสามารถใช้ตรวจคัดกรองผู้ป่วยโรคไข้วัดข้อยุลงลายได้ (Rianthavorn, *et al.*, 2010) การตรวจหา IgM ในตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยจะแสดงถึงระยะเวลาของการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยาได้ โดยระดับ IgM ในตัวอย่างซีรัมของผู้ป่วยจะเพิ่มขึ้นหลังจากการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยามาแล้ว 2 สัปดาห์ ดังนั้นภายในสัปดาห์แรกของการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา จะไม่สามารถตรวจหา IgM ในตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยได้ ต้องอาศัยการตรวจหา RNA ของไวรัสชิคุนกุนยาแทน (Taubitz *et al.*, 2007)

แม้ว่าการศึกษารุ่นนี้จะแสดงให้เห็นว่า rE2 protein สามารถนำไปเป็นวัตถุดิบสำหรับพัฒนาชุดทดสอบชนิด IC เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสชิคุนกุนยาได้ แต่ยังคงต้องการศึกษาในอีกหลายด้าน เช่น การเพิ่มความเข้มของแถบ test line และ control line การเพิ่มความจำเพาะต่อแอนติบอดีในตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคไข้วัดข้อยุลงลาย โดยอาจเพิ่มโปรตีนส่วนอื่นๆของไวรัส ชิคุนกุนยา เช่น โปรตีน E1 หรือ โปรตีน capsid เข้าไปในชุดตรวจดังกล่าว นอกจากนี้การศึกษาถึงประสิทธิภาพในการตรวจหาระดับ IgM ในตัวอย่างซีรัมผู้ป่วย การศึกษา cross reaction กับตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคไข้วัดข้อยุลงลายที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสชิคุนกุนยา สายพันธุ์อื่นๆ เช่น สายพันธุ์ S27- African prototype สายพันธุ์ TSI-GSD-218 และสายพันธุ์ Wuerzburg การศึกษา cross reaction กับตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคไข้วัดข้อยุลงลายและโรคไข้วัดข้อยุลงลายอื่น ๆ ก็ถือว่ามีมีความสำคัญ เพราะจะช่วยให้การวินิจฉัยโรคไข้วัดข้อยุลงลายได้ถูกต้องมากและแม่นยำมากยิ่งขึ้น

การพัฒนาชุดทดสอบถือเป็นแนวทางหนึ่งสำหรับการป้องกันและควบคุมการระบาดของโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพราะชุดทดสอบถือเป็นเครื่องมือที่สำคัญที่จะช่วยคัดกรองผู้ป่วยและช่วยในการตรวจวินิจฉัยโรคของแพทย์ให้ถูกต้องมากยิ่งขึ้น ทำให้ผู้ป่วยได้รับการรักษาอย่างทันท่วงที สามารถจำกัดพื้นที่การระบาดของโรคได้ ปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเข้าชุดทดสอบหลายชนิด เช่น ชุดตรวจโรคไข้วัดข้อยุลงลาย โรคไวรัสตับอักเสบ โรคเอดส์ เป็นต้น ดังนั้นการพัฒนาชุดทดสอบจึงเป็นการพึ่งพาตนเองและลดการนำเข้าชุดทดสอบดังกล่าว นอกจากนี้ หากเราสามารถพัฒนาชุดทดสอบให้มีประสิทธิภาพ ยังสามารถส่งออกไปขายยังนานาประเทศ เป็นการสร้างรายได้ให้กับประเทศอีกด้วย

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- สำนักโรคระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค. 2552. **สถานการณ์โรคไข้ชikungunya (Chikungunya fever) ปี 2552**. แหล่งที่มา <http://beid.ddc.moph.go.th/>.
- Bodenmann, P. and B. Genton. 2006. **Chikungunya: an epidemic in real time**. *Lancet*. 368: 258
- Bréhin, A.C., L. Rubrecht, M.E. Navarro-Sanchez, V. Maréchal, M.P. Frenkiel, P. Lapalud, D. Laune, A.A. Sall and P. Desprès. 2008. **Production and characterization of mouse monoclonal antibodies reactive to Chikungunya envelope E2 glycoprotein**. *Virology*. 371: 185–195.
- Brington, S.W., O.W. Prozesky and A.L. Harpe. 1983. **Chikungunya virus infection. A retrospective study of 107 cases**. *S. Afr. Med. L.* 63: 313-5.
- Chandak, N.H., R.S. Kashyap, D. Kabra, P. Karandikar, S. Sonali, S.H. Morey, H.J, Purohit, G.M. Taori and H.F. Dagainawala. 2009. **Neurological complications of Chikungunya Virus infection**. *Neurol. India*. 57(2): 177-80.
- Chevillon, C., L. Briant, F. Renaud and C. Devaux. 2008. **Chikungunya threat: an ecological and evolutionary perspective**. *Trends Microbiol.* 16: No.2.
- Cho, B., B.Y. Jeon, J. Kim, J. Noh, J. Kim, M. Park and S. Park. 2008. **Expression and Evaluation of Chikungunya Virus E1 and E2 Envelope roteins for Serodiagnosis of Chikungunya Virus Infection**. *Yonsei. Med. J.* 49(5): 828 – 835.
- Clarke, D.H. and J. Casals. 1958. **Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod borne viruses**. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 7: 561–573

- Eckels, K.H., V.R. Harrison and F.M. Hetrick. 1970. **Chikungunya virus vaccine prepared by Tween-Ether extraction.** Appl. Microbiol. 19(2): 321–5.
- Edelman, R., C.O. Tacket, S. S. Wasserman, S.A. Bodison, J.G. Perry and J.A. Mangiafico. 2000. **Phase II safety and immunogenicity study of live chikungunya virus vaccine TSI-GSD-218.** Am. J. Trop. Med. Hyg. 62(6): 681–685.
- Ezzedine, K., C. Cazanave, T. Pistone, M.C. Receveur, D. Neau, J.M. Ragnaud and [D. Malvy](#). 2008. **Dual infection by Chikungunya virus and other imported infectious agent in a traveller returning from India.** Travel Med. Inf. Dis. 6: 152-4.
- Gadkari, D. A. and B. H. Sheikh. 1984. **IgM antibody capture ELISA in the diagnosis of Japanese encephalitis, West Nile and dengue virus infections.** Indian J. Med. Res. 80: 613–619
- Gerardin, P., G. Barau, A. Michault, M. Bintner, H. Randrianaivo, G. Choker, Y. Lenglet, Y. Touret, A. Bouveret, P. Grivard, K. Roux, S. Blanc, I. Schuffenecker, T. Couderc, F.A. Seisdedos, M. Lecuit and P.Y. Robillard. 2008. **Multidisciplinary Prospective Study of Mother-to-Child Chikungunya infections on the Island of La Reunion.** PLoS. Med. 5(3): 413-423.
- Halstead, S.B., C. Yamarat and J.E. Scanlon. 1963. **The Thai hemorrhagic fever epidemic of 1962: a preliminary report.** J. Med. Assoc. Thailand. 46: 449–462.
- Harrison, V.R., [K. H. Eckels](#), [P. J. Bartelloni](#) and [C. Hampton](#). 1971. **Production and evaluation of a formalin-killed Chikungunya vaccine.** J. Immunol. 107: 643–7.
- Hansen, L.H., S. Knudsen and S.J. Sørensen. 1997. **The Effect of the *lacY* Gene on the Induction of IPTG Inducible Promoters, Studied in *Escherichia coli* and**

Pseudomonas fluorescens. Curr. Micro. 36: 341-347.

Jones, P.G., A.V. Ruth, and C.F. Neidhardt. 1987. **Induction of Proteins in Response to Low Temperature in *Escherichia coli***. J. Bact. 169: 2092-2095.

Khan, A.H., K. Morita, M.C. Parquet, F. Hasebe, E.G.M. Mathenge and A. Igarashi. 2002. **A Complete nucleotide sequence of Chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site**. J. Gen. Virol. 83: 3075–83.

Levitt, N.H., H.H. Ramsburg, S.E. Hasty, P.M. Repik, F.E. Jr. Cole and H.W. Lupton. 1986. **Development of attenuated strain of chikungunya virus for use in vaccine production**. Vaccine. 4: 157–62.

Livingstone, C.D. and G.J. Barton. 1993. **Protein sequence alignment : a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation**. Comput. Appl Biosci. 9: 745-56.

Muthumani, K., K. M. Lankaraman, D. J. Laddy, S.G. Sundaram, C. W. Chung, E. Sako, L. Wu, A. Khan, N. Sardesai, J.J. Kim, P. Vijayachari and D.B. Weiner. 2008. **Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccine against Chikungunya virus**. Vaccine. 26: 5128–34.

Pavri, K.M. 1964. **Presence of Chikungunya antibodies in human sera collected from Calcutta and Jamshedpur before 1963**. Indian. J. Med. Res. 52: 698–702.

Powers, M.A. and H. L. Christopher. 2007. **Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus**. J. Gen. Virol. 88: 2363–2377.

Ranadive, S.N. and K. Banerjee. 1990. **Cloning & expression of chikungunya virus genes coding structural proteins in *Escherichia coli***. Indian. J. Med. Res. 91: 386- 92.

Rezza, G., L. Nicoletti, R. Angelini, R. Romi, A.C. Finarelli, M. Panning, P. Cordioli, C. Fortuna, S. Boros, F. Magurano, G. Silvi, P. Angelini, M. Dottori, M.G. Ciufolini, G.C. Majori, and A. Cassone. 2007. **Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in temperate region.** *J. Lancet.* 370: 1840–1846.

Rianthavorn, P., N. Wuttirattanakowit, K. Prianantathavorn, N. Limpaphayom, A. Theamboonlers and Y.ong Poovorawan. 2010. **Evaluation of a rapid assay for detection of IgM antibodies to Chikungunya.** *SouthEast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 41: 92-96.

Robinson, M.C. 1955. **An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–53.** *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 49, 28–32.

Ross, R.W. 1956. **The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic.** *J. Hyg. (Lond).* 54: 177–191.

Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

_____. and D.W. Russell. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

Schilling, S., P. Emmerich, S. Günther and S. J. Chanasit. 2009. **Dengue and Chikungunya virus co-infection in a German traveler.** *J. Clin. Virol.* 45(2): 163-4.

Sissoko, D., D. Malvy, K. Ezzedine, P. Renault, F. Moschetti and M. Ledrans. 2009. **Post Epidemic Chikungunya Disease on Reunion Island: Course of Rheumatic Manifestations and Associated Factors over a 15-Month Period.** *PLoS Med.* 3(3): e389: 1-6.

- Sourisseau, M., C. Schilte, N. Casartelli, C. Trouillet, F.G. Benhassine, D. Rudnicka, N.S. Foulon, K.L. Roux, M.C. Prevost, H. Fsihi, M.P. Frenkiel, F. Blanchet, P.V. Afonso, P.E. Ceccaldi, S. Ozden, A. Gessain, I. Schuffenecker, B. Verhasselt, A. Zamborlini, A. Saïb, F.A. Rey, F.A. Seisedos, P. Desprès, A. Michault, M.L. Albert and O. Schwartz. 2007. **Characterization of reemerging Chikungunya virus.** PLoS. Pathog. 3(6): e89.
- Strauss, J.H. and E.G. Strauss. 1994. **The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution.** Microbiol. Rev. 58: 491–562.
- Taubitz, W., J.P. Cramer, A. Kapaun, M. Pfeffer, C. Drosten, G. Dobler, G.D. Burchard and T. Löscher. 2007. **Chikungunya fever in travelers: clinical presentation and course.** Clin. Infect. Dis. 1; 45: e1-4.
- Tiwari, M., S.R. [Santhosh, M. Khan](#), P. K. [Dash and](#) P.V.L. [Rao](#). 2009. **Assessment of immunogenic potential of Vero adapted formaline inactivated vaccine derived from novel ECSA genotype of Chikungunya virus.** Vaccine. 27: 2513-2522.
- Valamparampil J.L., S. Chirakkarot, S. Letha, C. Jayakumar and K.M. Gopinathan. 2009. **Clinical profile of Chikungunya in infants.** Indian. J. Pediatr. 76(2): 151-5.
- Yadav, J.S. 2006. **A special issue on Chikungunya.** ENVIS News Letter. Issue 2, September.
- Yadav, P. M.D. Gokhale, P.V. Barde, D.K. Singh, A.C. Mishra and D.T. Mourya. 2003. **Experimental transmission of Chikungunya virus by Anopheles stephensi mosquitoes.** Acta. Virol. 47: 45–47.



ภาคผนวก



สารเคมี

1. สารเคมีสำหรับการ cloning

1.1 การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme)

ตารางผนวกที่ ก 1 การเตรียม reaction mixture สำหรับตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

Mixture	Volume (μ l)	Final concentration
10x buffer	5	1x
<i>Eco</i> RI หรือ <i>Not</i> I	5	50 U
plasmid DNA	10	
dH ₂ O	30	

1.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (Ligation)

ตารางผนวกที่ ก 2 การเตรียม reaction mixture เพื่อทำ ligation

Mixture	Volume (μ l)
5x ligation buffer	4
DNA vector	6
Insert DNA	4
T4 DNA ligase	1
dH ₂ O	15

1.3 เอนไซม์ตัดจำเพาะ

ตารางผนวกที่ ก 3 เอนไซม์ตัดจำเพาะ

Enzyme	Recognition Sequence		Concentration (U/ μ l)	Company
	5'----3'	3'----5'		
<i>EcoRI</i>	G'AATTC	CTTAA'G	10	Takara
<i>NotI</i>	GC'GGCCGC	CGCCGG'CG	10	Takara

2. สารเคมีสำหรับการทำ RT-PCR และ PCR

ตารางผนวกที่ ก 4 การเตรียม Onestep RT-PCR reaction mixture

Mixture	Volume (μ l)	Final concentration
dNTP	2	400 uM of each dNTP
Forward Primer	1	0.4 μ M
Reverse Primer	1	0.4 μ M
RNA Template	2	0.2 μ g
QiaGEN Onestep RT-PCR Enzyme Mix	2	-
5x Q buffer	10	1x
5x QiaGEN Onestep RT-PCR Buffer	10	1x
RNase-free water	22	-
Total volume	50	

ตารางผนวกที่ 5 การเตรียม PCR reaction mixture

Mixture	Volume (μ l)	Final concentration
10x buffer	2	1x
2x PCR master Mix	10	1x
primer forward	0.5	
primer reverse	0.5	
dH ₂ O	6.5	
Template DNA	0.5	
Total volume	20	

3. สารเคมีสำหรับการ Transformation

3.1 สารเคมีในการเตรียม competent cell

- **TFB 1 buffer pH 5.8**; 50 mM MnCl₂, 30 mM potassium acetate, 10 mM CaCl₂, 15% glycerol ปรับ pH ด้วย KOH (กรองผ่าน 0.45 μ m filter)

- **TFB 2 buffer pH 6.8**; 10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 15% glycerol ปรับ pH ด้วย KOH (กรองผ่าน 0.45 μ m filter)

4. IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside); เตรียม 1 M IPTG โดยชั่ง 0.238 g ละลายใน น้ำกลั่น 1 ml

5. สารเคมีสำหรับ SDS-PAGE

5.1 30% Acrylamide; acrylamide 30 g, bisacrylamide 0.8 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml

5.2 4x Tris HCl/SDS pH 8.8; น้ำกลั่น 300 ml, tris base 91 g, SDS 2 g ปรับ pH ให้เป็น pH 8.8 เติมน้ำให้ครบ 500 ml และกรองด้วย 0.45 μ m filter

5.3 4x Tris HCl/SDS pH 6.8; น้ำ 50 ml, tris base 6.05 g, SDS 0.4 g ปรับ pH ให้เป็น 6.8 เติมน้ำให้ได้ 100 ml และกรองด้วย 0.45 μ m filter

5.4 5x Glycine buffer; tris base 15.1 g, glycine 94 g, 10% SDS 50 ml เติมน้ำให้ครบ 1 l

5.5 Loading buffer ; 6% β -ME, 6% SDS, 0.6% bromophenol blue และ 20% glycerol

5.6 Ammonium persulfate (10%); ammonium persulfate 1 g ละลายในน้ำกลั่น 10 ml เก็บสารละลายที่ 4°C นานไม่เกิน 1 สัปดาห์

5.7 สารเคมีสำหรับ Coomassie staining

- Coomassie stain; Coomassie Brilliant blue R 250 0.25g, methanol 45 ml, น้ำกลั่น 45 ml, glacial acetic acid 10 ml

- destaining solution; 45% methanol, 45% น้ำกลั่น, 10% acetic acid

ตารางผนวกที่ 6 การเตรียม 15% polyacrylamide gel

Mixture	Volume
Stacking gel	
- Distilled water	1.5 ml
- 1.5 M Tris-HCl pH 8.8	0.63 ml
- 10% SDS	25 ul
- 30% acrylamide	0.33 ml
- 10% ammonium persulfate	12.5 ul
- TEMED	2.5 ul
Separating gel	
- Distilled water	1.13 ml
- 1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1.25 ml
- 10% SDS	50 ul
- 30% acrylamide	2.5 ml
- 10% ammonium persulfate	25 ul
- TEMED	2.5 ul

6. สารเคมีสำหรับทำ Western blotting

- transfer buffer; 25 mM tris base, 150 mM glycine, 20% methanol
ชั่ง 3 g tris base, 14.4 g glycine ละลายในน้ำกลั่น 800 ml และเติม 200 ml methanol
- 2% BSA; 2 g BSA ละลายใน 1x PBST 100 ml
- rabbit anti-mouse; 1 μ l ของ rabbit anti-mouse เจือจางใน 1x PBST 1000 μ l
- DAB substrate; 1 mg DAB ละลายใน 1x PBST 10 ml

7. สารเคมีสำหรับทำ agarose gel electrophoresis

- 50x TAE buffer; Tris base 121 g, น้ำกลั่น 300 ml, glacial acetic acid 28.55 ml, 0.5 M Na-EDTA 50 ml ปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วย NaOH ปรับปริมาตรให้ครบ 500 ml นำไป autoclave
- 1% agarose gel; agarose 1 g, 1x TAE 100 ml ละลายในเครื่อง microwave 2 นาที หรือจนสารละลายใส ปล่อยให้อุณหภูมิเย็นลงประมาณ 50°C เทลงใน tray สำหรับเตรียมเจล จากนั้นใส่ comb เพื่อให้เกิดช่อง
- loading dye; 0.25% Bromphenol blue, 30% glycerol

8. Gel extraction kit (Qiagen kit); QG buffer, PE buffer และ EB buffer

9. สารเคมีสำหรับทำ dot blotting

- nitrocellulose membrane
- 5% skim milk
- 1x PBS + 0.05% Tween 20
- 1° antibodies (ตัวอย่างซีรัมผู้ป่วยโรคไข้วัดข้อขุ่นลาย)
- 2° antibodies (goat anti-human)
- DAP substrate; 1 mg DAP ละลายใน 1x PBST 10 ml

10. PBS pH 7.4

KH_2PO_4 , 0.2 g, NaCl 0.8 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g, KCl 0.2 g ปรับ pH ให้ได้ 7.4 และปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

11. PBS-T pH 7.4

PBS 100 ml เติม Tween 20 1 ml

12. 10% SDS

SDS (sodium dodesyl sulfate) 10 g เติมน้ำ deionize 100 ml

13. TEMED

สำหรับ TEMED (N,N,N',N' – tetramethyl ethylenediamine) ใช้ได้เลยไม่ต้องเจือจาง

14. PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentus, USA)

อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

1. LB medium (1000 ml)

- Tryptone 10 g
- Yeast extract 5 g
- NaCl 10 g
- dH₂O ให้เป็น 1000 ml
- Autoclave

2. SOC medium 100 ml

- Bacto tryptone 2 g
- Yeast extract 0.5 g
- 1M NaCl 1 ml
- 1 M KCl 0.25 ml
- 1 ml of Mg²⁺ stock (1 M MgCl₂.6H₂O, 1 M MgSO₄.7H₂O, filter-sterilized)
- 1 ml of 2M glucose, filter-sterilized
- Autoclave

3. LB medium agar (500 ml)

- Tryptone 5 g
- Yeast extract 2.5 g
- NaCl 5 g
- เต็ม agar 7.5 g
- dH₂O ให้เป็น 500 ml
- Autoclave



1. การเตรียม competent cell

เลี้ยงเชื้อ *E.coli* ในอาหาร LB medium ที่ 37°C นานข้ามคืน แล้ว subculture เชื้อที่ได้ในอัตราส่วน 1:100 กล่าวคือ นำเชื้อที่เลี้ยงข้ามคืน 1 ml เติมลงในอาหาร LB broth medium 100 ml ใน flask 250 ml เขย่าที่ 37°C นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นแช่ flask ในน้ำแข็ง 5 นาที ย้ายเซลล์ใส่หลอดใหม่ ปั่นตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 4,000 xg ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที ทิ้งส่วนใสและแช่เซลล์ในน้ำแข็ง ละลายตะกอนด้วย TFB1 buffer 30 ml และแช่เซลล์ในน้ำแข็งนาน 90 นาที แล้วปั่นตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 4,000 xg ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที ทิ้งส่วนใสและแช่เซลล์ในน้ำแข็ง ละลายตะกอนด้วย TFB2 buffer 4 ml ในน้ำแข็ง ทำการแบ่งเซลล์ใส่หลอด microcentrifuge tube หลอดละ 200 μ l และเก็บรักษาเซลล์ที่ -80°C จนกว่าจะนำมาใช้งาน

2. การสกัด DNA จาก agarose gel ด้วยชุดสกัด QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany)

1. ทำการตัดชิ้น DNA จาก agarose gel
2. ชั่งน้ำหนักของเจล แล้วเติม QG buffer ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล
3. นำไปปั่นที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีหรือจนกระทั่งเจลละลายหมด อาจนำมา vortex เป็นครั้งคราว
4. เติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากัน
5. ถ่ายตัวอย่างลงใน QIAquick spin column นำไปปั่นเหวี่ยง 10000 รอบต่อนาที เวลา 1 นาที
6. ทิ้งส่วน flow through แล้วเติม QG buffer 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง 10000 รอบต่อนาที เวลา 1 นาที
7. ทิ้งส่วน flow through แล้วเติม PE buffer 750 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง 10000 รอบต่อนาที เวลา 1 นาที
8. ทิ้งส่วน flow through แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 13000 รอบต่อนาที เวลา 1 นาที
9. นำ QIAquick spin column วางในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม EB buffer 50 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง 13000 รอบต่อนาที เวลา 1 นาที
10. เก็บส่วน flow through นำไปตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis

3. การสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Germany)

1. ละลายตะกอนเซลล์ด้วย P1 buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วถ่ายสู่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2. เติม P2 buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการพลิกหลอด 4-6 ครั้ง
3. เติม N3 buffer ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการพลิกหลอด 4-6 ครั้ง
4. นำไปปั่นเหวี่ยง 13000 รอบต่อนาที เวลา 10 นาที
5. ดูดส่วนใสใส่ QIAprep Spin column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 13000 รอบต่อนาที เวลา 1 นาที ที่มีส่วน flow through
6. เติม PB buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 13000 รอบต่อนาที เวลา 1 นาที ที่มีส่วน flow through
7. เติม PE buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 13000 รอบต่อนาที เวลา 1 นาที ที่มีส่วน flow through
8. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 13000 รอบต่อนาที เวลา 1 นาที
9. เติม EB buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 13000 รอบต่อนาที เวลา 1 นาที
10. เก็บส่วน flow through นำไปตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis

4. การทำ transformation (Sambrook *et al.*, 1989)

นำ competent cell จาก -80°C มาทำให้ละลายบนน้ำแข็ง แล้วใส่ ligated DNA 5-10 μ l ลงไปในหลอด competent cell บ่มในน้ำแข็ง 30 นาที ทำ heat shock ที่ 42°C นาน 90 วินาที จากนั้นลงแช่ในน้ำแข็งทันที นาน 3-5 นาที เติมอาหาร SOC medium 900 μ l เขย่าที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมงปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 4,500 \times g นาน 1 นาที ดูดส่วนใสทิ้งให้เหลือประมาณ 150-200 μ l ละลายตะกอนโดยการดูดขึ้นดูดลง แล้ว spread ลงบน LB agar plate ที่มี X-Gal บ่มข้ามคืนที่ 37°C ข้ามคืน (12-18 ชั่วโมง) คัดเลือก white colony มาทำการตรวจสอบด้วย PCR หรือ ตัดด้วยเอ็นไซม์เพื่อยืนยันผล

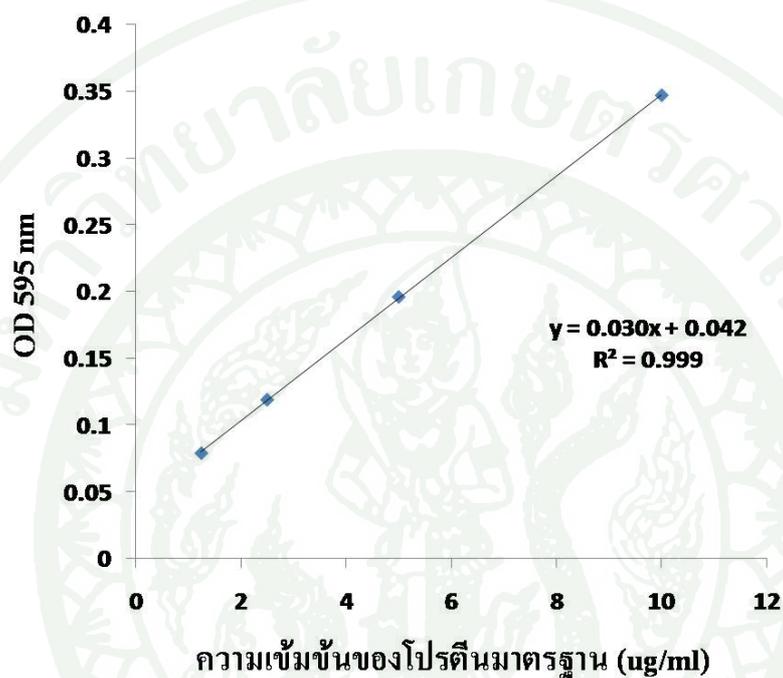
5. การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (ligation)

เตรียม ligation reaction mixture ตามตารางภาคผนวกที่ 2 โดยผสม ligation reaction, DNA vector และ insert DNA เข้าด้วยกันใน PCR tube นำไปบ่มที่ 15°C ในเครื่อง thermal cycler (eppendorf) นานข้ามคืน จากนั้นนำ ligated DNA ที่ได้ ถ่ายเข้าสู่เชื้อ *E.coli* เพื่อเพิ่มปริมาณและคัดเลือกโคลนที่ให้ผลบวกสำหรับนำไปใช้งานต่อไป

6. การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (Sigma, USA)

1. ทำการเจือจางโปรตีนมาตรฐานกับน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2.5 µg/ml, และ 1.25 µg/ml
2. เติม Bradford reagent 1 มิลลิลิตร ต่อโปรตีนมาตรฐานที่ทำการเจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร
3. ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการ vortex
4. ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที
5. นำไปวัดค่า OD 595 nm
6. สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD 595 nm (แกน Y) กับ ความเข้มข้นของโปรตีน (แกน X)
7. ทำการเจือจางตัวอย่างโปรตีนกับน้ำกลั่นที่อัตราส่วน 1:10, 1:100, และ 1:1,000
8. เติม Bradford reagent 1 มิลลิลิตร ต่อโปรตีนมาตรฐานที่ทำการเจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร
9. ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการ vortex
10. ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที
11. นำไปวัดค่า OD 595 nm
12. คำนวณค่าความเข้มข้นของตัวอย่างโปรตีนจากสมการ

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD 595 nm กับ ความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน



ภาพผนวกที่ ข 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า OD 595 nm กับ ความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน

7. การทำ Dialysis และการ refolding protein

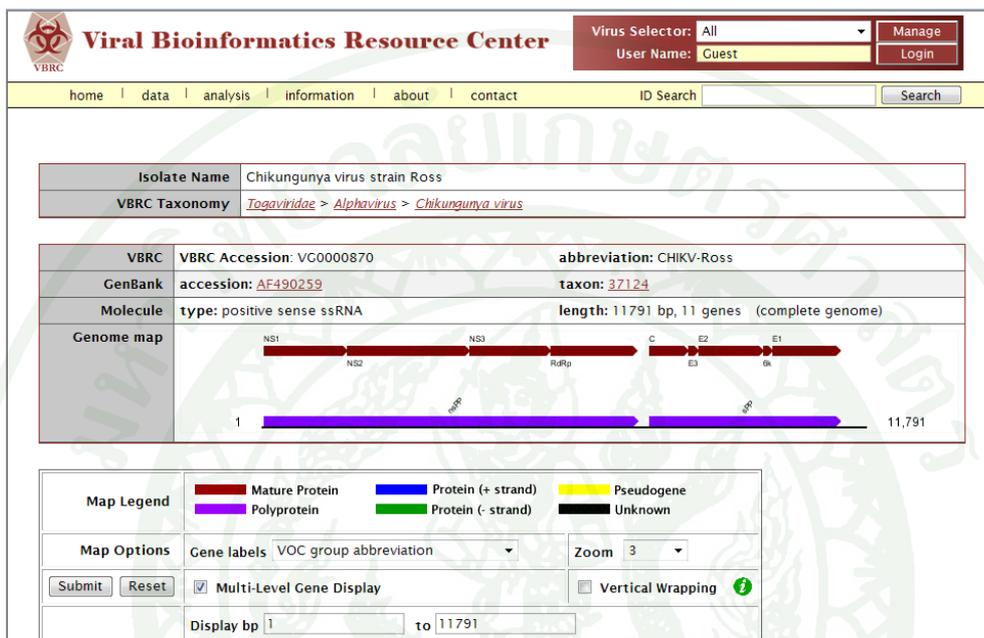
1. เตรียม 1x dialysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH8.5) ที่เติม 0.1 mM DDT โดยใช้ปริมาตร 50 เท่าของโปรตีนที่ได้จากการทำ solubilization
2. Dialyze ที่ 4° C นาน 3 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยน buffer ที่ปริมาตรเท่าเดิม แล้ว dialyze ต่ออีก 3 ชั่วโมง
3. เปลี่ยน buffer อีกครั้งแต่ไม่เติม DDT แล้ว dialyze ต่ออีก 3 ชั่วโมงหรือมากกว่านั้น
4. เปลี่ยน buffer เป็น 1x dialysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH8.5) ที่เติม 1 mM reduced glutathione และ 0.2 mM oxidized glutathione โดยปริมาตรที่ใช้ คือ 25 เท่าของโปรตีนที่ได้จากการทำ solubilization
5. dialyze ที่ 4° C นานข้ามคืน



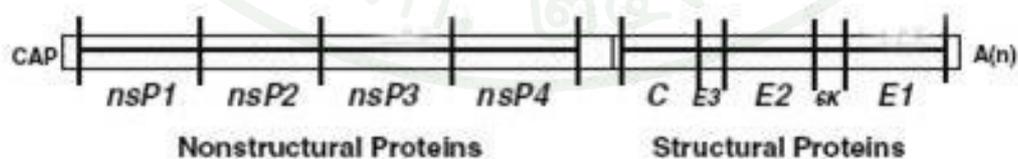
ภาคผนวก ค

โครงสร้างจีโนมของไวรัสซิกุนกุนยา สายพันธุ์ Ross และ โครงสร้างของพลาสมิด pGEM®-T Easy และ pET21a

โครงสร้างจีโนมของไวรัสชิคุนกุนยา สายพันธุ์ Ross (AF490259)



ภาพผนวกที่ ค 1 ข้อมูลโครงสร้างจีโนมของไวรัสชิคุนกุนยา สายพันธุ์ Ross (AF490259)



ภาพผนวกที่ ค 2 โครงสร้างจีโนมของไวรัสชิคุนกุนยา สายพันธุ์ Ross (AF490259)

โครงสร้างของยีน E2 ของไวรัสชิคุนกุนยา สายพันธุ์ Ross (AF490259)

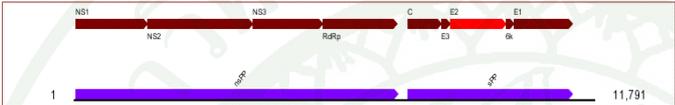
Viral Bioinformatics Resource Center

Virus Selector: All
 User Name: Guest

home | data | analysis | information | about | contact ID Search

VBRC Gene Detail

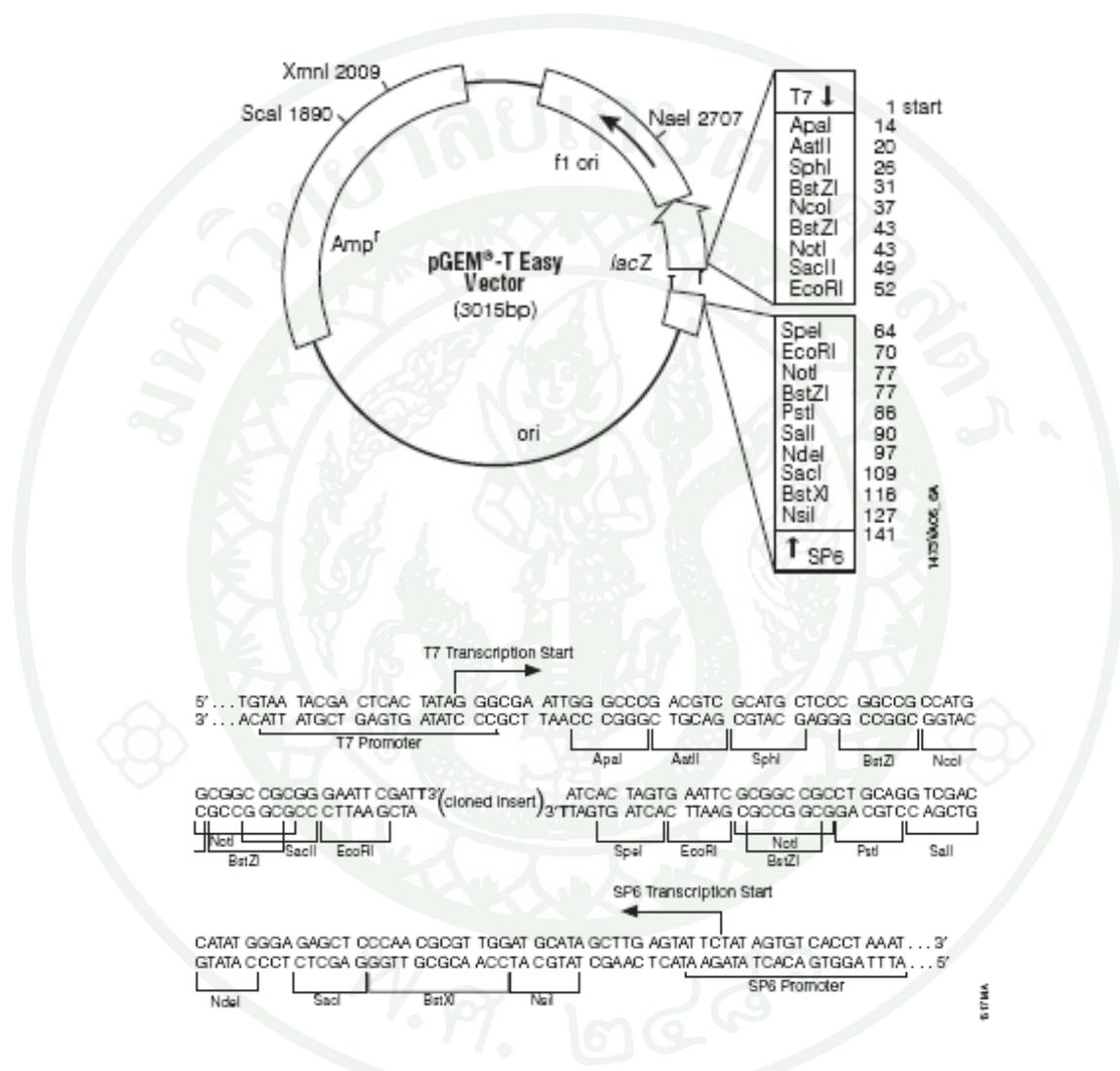
Display: VOC group abbreviation Zoom 3 (For full gene details, mouse over gene graphic)



GENE	VBRC accession: VP0031467	name: CHIKV-Ross-E2
	(4 older abbreviations)	
Protein Family (VOC)	VOC ID: VBRC VC888	name: Envelope Glycoprotein 2
	abbr: E2	function: Envelope glycoprotein E2
	alternate abbr:	
Molecule	type: mature_protein	length: 1266 bp, 422 aa
	molecular weight: 46,950	pt: 8.24
Annotation	added: 10/15/2002	source: manual
Location	(8521..9786) in: Chikungunya virus strain Ross (GenBank: AF490259)	
VBRC Taxonomy	Togaviridae > Alphavirus > Chikungunya virus	

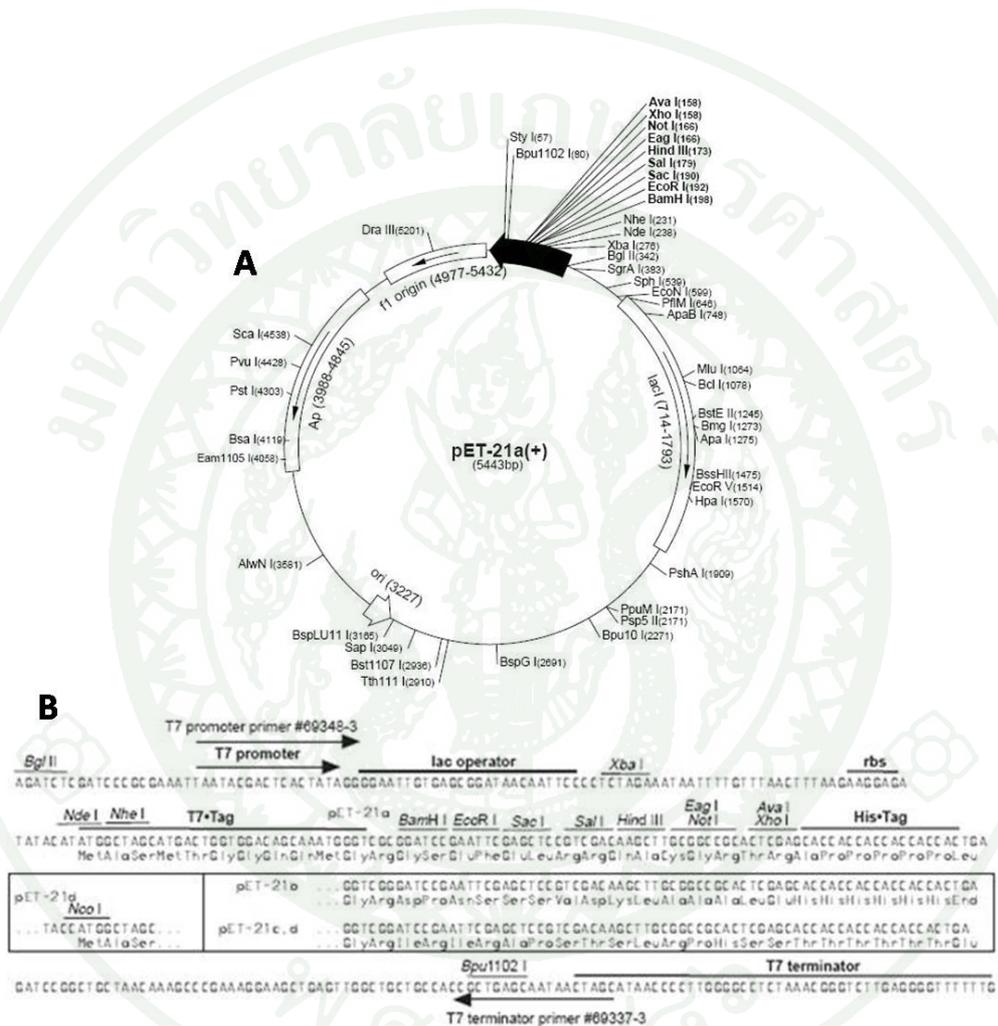
ภาพผนวกที่ 3 ข้อมูลโครงสร้างยีน E2 ของไวรัสชิคุนกุนยา สายพันธุ์ Ross (AF490259)

โครงสร้างจีโนมของพลาสมิด pGEM®-T Easy



ภาพผนวกที่ ค 4 โครงสร้างจีโนมของพลาสมิด pGEM®-T Easy

โครงสร้างจีโนมของพลาสมิด pET21a



ภาพผนวกที่ ค 5 โครงสร้างจีโนมของพลาสมิด pET21a



ภาคผนวก ง

ผลการ Blast นิวคลีโอไทด์ของยีน E2 บน pGEMT-CHK-E2 กับฐานข้อมูล NCBI และ
ผลการ Blast กรดอะมิโนของยีน E2 บน pGEMT-CHK-E2 กับฐานข้อมูล NCBI

ผลการ Blast นิวคลีโอไทด์ของยีน E2 บน pGEMT-CHK-E2 กับฐานข้อมูล NCBI

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AF490259.3	Chikungunya virus strain Ross, complete genome	2311	2311	100%	0.0	99%
AF339485.1	Chikungunya virus strain S27 nonstructural protein 4 gene, partial cc	2311	2311	100%	0.0	99%
HM045821.1	Chikungunya virus strain A301, complete genome	2305	2305	100%	0.0	99%
AF369024.2	Chikungunya virus strain S27-African prototype, complete genome	2283	2283	100%	0.0	99%
HM045811.1	Chikungunya virus strain Ross low-psq, complete genome	2250	2250	100%	0.0	98%
HM045806.1	Chikungunya virus strain ALSA-1, complete genome	2233	2233	100%	0.0	98%
HM045792.1	Chikungunya virus strain "Vereeniging", complete genome	2228	2228	100%	0.0	98%
HM045795.1	Chikungunya virus strain SAH2123, complete genome	2217	2217	100%	0.0	98%
HM045805.1	Chikungunya virus strain AR 18211, complete genome	2215	2215	100%	0.0	98%
HM045809.1	Chikungunya virus strain LSFS, complete genome	2128	2128	100%	0.0	96%
HM045822.1	Chikungunya virus strain HB78, complete genome	2122	2122	100%	0.0	96%
EF027139.1	Chikungunya virus strain IND-00-MH4, complete genome	2106	2106	99%	0.0	96%
HM045812.1	Chikungunya virus strain UqAq4155, complete genome	2100	2100	99%	0.0	96%
HM045793.1	Chikungunya virus strain CAR256, complete genome	2100	2100	100%	0.0	96%
HM045784.1	Chikungunya virus strain DakAr B 16878, complete genome	2100	2100	99%	0.0	96%
JF274082.1	Chikungunya virus isolate IND-06-Guj, complete genome	2089	2089	100%	0.0	96%
JF272479.1	Chikungunya virus isolate IND-06-Guj E2 protein gene, partial cds	2089	2089	100%	0.0	96%
HM045823.1	Chikungunya virus strain Angola M2022, complete genome	2089	2089	99%	0.0	96%
HM045801.1	Chikungunya virus strain SL-CK1, complete genome	2089	2089	100%	0.0	96%
GU013529.2	Chikungunya virus isolate LK(PB)chik6008, complete sequence	2089	2089	100%	0.0	96%

ภาพผนวกที่ 1 ผลการ Blast นิวคลีโอไทด์ของยีน E2 บน pGEMT-CHK-E2 กับฐานข้อมูล NCBI

ผลการ Blast กรดอะมิโนของยีน E2 บน pGEMT-CHK-E2 กับฐานข้อมูล NCBI

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value
AAM10747.2	structural polyprotein [Chikungunya virus] >gb AAO33341.1 structu	884	884	100%	0.0
NP_690589.2	structural polyprotein [Chikungunya virus] >sp Q8JUX5.2 POL5_CHIK	880	880	100%	0.0
ADG95932.1	structural polyprotein [Chikungunya virus]	870	870	100%	0.0
ADG95897.1	structural polyprotein [Chikungunya virus]	866	866	100%	0.0
ACZ72971.1	structural polyprotein [Chikungunya virus]	865	865	100%	0.0
ADG95902.1	structural polyprotein [Chikungunya virus]	863	863	100%	0.0
ABD95938.1	structural polyprotein [Chikungunya virus] >emb CAJ90476.1 struct	863	863	100%	0.0
ABX38965.1	structural polyprotein [Chikungunya virus]	863	863	100%	0.0
ABN04190.1	structural polyprotein [Chikungunya virus]	863	863	100%	0.0
CAJ90470.1	structural polyprotein [Chikungunya virus] >emb CAJ90481.1 struct	863	863	100%	0.0
BAH97933.1	structural polyprotein [Chikungunya virus]	863	863	100%	0.0
ACA81773.1	structural polyprotein [Chikungunya virus]	863	863	100%	0.0
ABN04188.1	structural polyprotein [Chikungunya virus] >gb ACM09917.1 structu	863	863	100%	0.0
ABN04192.1	structural polyprotein [Chikungunya virus] >gb ABN04194.1 structu	863	863	100%	0.0
ACV88657.1	structural polyprotein [Chikungunya virus]	863	863	100%	0.0
ACZ98837.1	structural polyprotein [Chikungunya virus]	863	863	100%	0.0
ACY25940.1	structural polyprotein [Chikungunya virus]	863	863	100%	0.0
ABN04196.1	structural polyprotein [Chikungunya virus]	863	863	100%	0.0
ADC53730.1	structural polyprotein [Chikungunya virus]	863	863	100%	0.0
ACY09941.1	structural polyprotein [Chikungunya virus] >gb ACY09946.1 structu	863	863	100%	0.0
ABU93705.1	structural polyprotein [Chikungunya virus Wuerzburg 1]	863	863	100%	0.0

ภาพผนวกที่ 2 ผลการ Blast กรดอะมิโนของยีน E2 บน pGEMT-CHK-E2 กับฐานข้อมูล NCBI

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-สกุล	นายจิรัฏฐกร เรือรชนันต์กุล
วัน เดือน ปี เกิด	4 กุมภาพันธ์ 2522
สถานที่เกิด	อำเภอกันทรารมย์ จังหวัดศรีสะเกษ
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ตำแหน่งงานปัจจุบัน	นักวิทยาศาสตร์การแพทย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพด้านการแพทย์และสาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข