

การแสดงออกและลักษณะสมบัติของฮีโมแอกกลูทีนินจากไวรัสไข้หวัดนก (H5N1)  
ใน *Pichia pastoris*



นายรพี สีนเืองนอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF HEMAGGLUTININ FROM  
AVIAN INFLUENZA (H5N1) VIRUS IN *Pichia pastoris*



Mr. Rapee Sinnuengnong

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การแสดงออกและลักษณะสมบัติของฮีโมแอกกลูตินินจาก  
ไวรัสไข้หวัดนก (H5N1) ใน *Pichia pastoris*

โดย

นายรพี สิ้นเนืองนอง

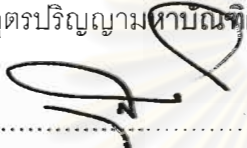
สาขาวิชา

จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม


อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

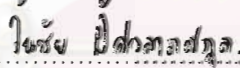
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัครวลาภสกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโท

  
..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ นารนนองบัว)

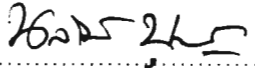
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัครวลาภสกุล)

  
..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุซาดา จันทร์ประทีป)

  
..... กรรมการ  
(อาจารย์ ดร. ปกรณ์ วินะยานวดีคุณ)

  
..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(อาจารย์ ดร. นลวัฒน์ บุญपालย์)

รพี ลินเนืองนอง : การแสดงออกและลักษณะสมบัติของฮีโมแอกกลูตินินจากไวรัสไข้หวัดนก (H5N1) ใน *Pichia pastoris*. (EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF HEMAGGLUTININ FROM AVIAN FLU (H5N1) VIRUS IN *Pichia pastoris*)

อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ. ดร. วันชัย อัครลาภสกุล, 106 หน้า.

เชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 เป็นเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคไข้หวัดใหญ่ในสัตว์ปีก ซึ่งเป็นโรคที่แพร่กระจายอย่างรวดเร็ว และเป็นสาเหตุให้เกิดความเสียหายทางด้านเศรษฐกิจและสาธารณสุข โปรตีนฮีโมแอกกลูตินินเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อวงจรชีวิตของไวรัส เพราะฮีโมแอกกลูตินินเป็นโปรตีนที่จะจับกับตัวรับของเซลล์เจ้าบ้าน ทำให้เข้าสู่เซลล์และเกิดการจำลองตัวเองได้ นอกจากนี้โปรตีนดังกล่าวถูกใช้ในการจัดจำแนกความรุนแรงของสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ โคลนแสดงออก และศึกษาสมบัติของโปรตีนฮีโมแอกกลูตินินจากไวรัสไข้หวัดนก (H5N1) ในยีสต์ *Pichia pastoris* ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำยีนฮีโมแอกกลูตินินจากไวรัสไข้หวัดนกจำนวน 3 สายพันธุ์ โดยเป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูง 2 สายพันธุ์และสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคต่ำ 1 สายพันธุ์ มาเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์แสดงออก pPIC2ZA เพื่อแสดงออกใน *P. pastoris* KM71 ผลการทดลองพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน HA ทั้งสาม แสดงออกภายในเซลล์ยีสต์ ขณะชักนำด้วย 4%(v/v) เมทานอล เป็นเวลา 2 วัน เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย Sodium dodecyl sulfate - Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ western blotting รีคอมบิแนนท์โปรตีน HA ทั้งสาม มีขนาดประมาณ 95 กิโลดาลตัน และเกิดแถบโปรตีนขนาดเล็ก ซึ่งอาจเกิดจากการถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสภายในเซลล์ยีสต์ เมื่อนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน HA ทั้งสาม ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Diethylaminoethyl cellulose (DEAE column) และนำไปศึกษาสมบัติของโปรตีน พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน HA ทั้งสามที่บริสุทธิ์บางส่วน สามารถเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงได้ และเมื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยคอลัมน์ Sephacryl S-200 และนำไปศึกษาสมบัติการเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงของโปรตีน และศึกษาการตัดด้วยเอนไซม์ Furin พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน HA ทั้งสามที่บริสุทธิ์ ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดง และไม่สามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ Furin ได้

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต <sup>รพี</sup> <sup>ลินเนืองนอง</sup>  
 สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม...ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก โฉม... อัครลาภสกุล  
 ปีการศึกษา....2553.....

# # 5072436223 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : INFLUENZA VIRUS/ HEMAGGLUTININ/*Pichia pastoris*/ EXPRESSION

RAPEE SINNUENGNONG : EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF  
HEMAGGLUTININ FROM AVIAN FLU (H5N1) VIRUS IN *Pichia pastoris*

ADVISOR : ASST. PROF. WANCHAI ASSAVALAPSAKUL, 106 pp

Avian influenza H5N1 virus, which causes flu in poultry, is a fast pandemic virus and causes major problems for economic and public health. Hemagglutinin (HA) is an essential protein for viral replication because it binds to a receptor on the host cell for viral entry and replication in host cell. Furthermore, hemagglutinin is used to identify the virulence strain of virus. The aim of this research was to clone, express and characterize hemagglutinin from avian flu (H5N1) virus in *Pichia pastoris*. In this research, the hemagglutinin gene from 3 strains of avian influenza virus, which are two strains of High Pathogenic Avian Influenza (HPAI) and one strain of Low Pathogenic Avian Influenza (LPAI), was ligated into pPICZαA expression vector for expression in *P. pastoris* KM71. The results showed that all three recombinant HA proteins were expressed in intracellular of yeast, while inducing with 4% (v/v) methanol for 2 days, which was analyzed by Sodium dodecyl sulfate - Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blotting. All three recombinant HA proteins were approximately 95 kDa and found as a degraded products which could result from protease activity in yeast cells. All three recombinant HA proteins were partially purified by Diethylaminoethyl cellulose (DEAE) column and were characterized. The result showed that all three partially purified recombinant HA proteins could hemagglutinate red blood cells. Moreover, all of the partially purified recombinant HA proteins were further purified with Sephacryl S-200 column. All three purified recombinant HA proteins were further characterized for hemagglutination activity and Furin cleavage assay. The results showed that all three purified recombinant HA proteins could not hemagglutinate red blood cells and could not be cleaved with Furin enzyme.

Department :.....Microbiology..... Student's Signature RAPEE SINNUENGNONG  
Field of Study :.....Industrial Microbiology.. Advisor's Signature WANCHAI ASSAVALAPSAKUL  
Academic Year :...2010.....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันชัย อัครเวลาภสกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น สอนเทคนิคต่าง ๆ ทางด้านชีวโมเลกุล และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธีรยวัน ประธานกรรมการสอบผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทรประทีป และ อาจารย์ ดร.นลวัฒน์ บุญญาลัย ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และช่วยให้ความคิดเห็นต่างๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ปภกรณ์ วินะยานุวัติคุณ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบ และยังให้ความช่วยเหลือในด้านการทำบริสุทธิ์โปรตีน รวมถึงให้คำปรึกษา คำแนะนำ ในส่วนของการศึกษาคุณสมบัติของโปรตีน

ขอขอบคุณ คุณชนิษฐา นิวาสะบุตร ที่ได้สอนเทคนิคต่างๆ เกี่ยวกับการทำวิจัยทางด้านชีวโมเลกุลให้กับข้าพเจ้า รวมถึงห้องๆ ห้อง 418 ที่ให้กำลังใจด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณ ห้องวิจัย 617/3 ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยให้คำปรึกษา เตรียมสารเคมีต่างๆ และให้ยืมห้องวิจัยในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

ขอขอบคุณ คุณวรวรชมน นิลสันเทียะ คุณสุกัญญา เกิดสุข และคุณอัมทิกา เมื่องวงษ์ รวมถึงพี่ๆ และเพื่อนๆ ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกคน ที่ได้ให้คำแนะนำดีๆ กับข้าพเจ้าขณะที่กำลังศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ญาติพี่น้อง ที่คอยเป็นกำลังใจ ถามไถ่สารทุกข์สุกดิบ และให้การสนับสนุนลูกคนนี้จนสำเร็จการศึกษาตามที่ตั้งใจไว้

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ณ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ปรีทศน์วรรณกรรม.....	3
2.1 เชื้อไวรัสไข้หวัดนก.....	3
2.2 ลักษณะของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก.....	4
2.3 วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซา เอ.....	5
2.4 โปรตีนนิวรามิनिเดส.....	6
2.5 โปรตีนฮีมาแอกกลูตินิน.....	7
2.6 ความรุนแรงของไวรัส.....	9
2.7 การเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดง.....	10
2.8 <i>Pichia pastoris</i> .....	10
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	14
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง.....	16
3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	16
3.1.1 แบคทีเรีย.....	16
3.1.2 ยีสต์.....	16
3.2 ไพรเมอร์.....	16
3.3 พลาสมิด.....	17
3.4 เอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	18

3.5 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	18
3.5.1 การเก็บรักษาแบคทีเรีย.....	18
3.5.1.1 การเก็บรักษาแบคทีเรียในระยะสั้น.....	18
3.5.1.2 การเก็บรักษาแบคทีเรียในระยะยาว.....	18
3.5.2 การเก็บรักษาไวรัส.....	19
3.5.2.1 การเก็บรักษาไวรัสในระยะสั้น.....	19
3.5.2.2 การเก็บรักษาไวรัสในระยะยาว.....	19
3.6 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด.....	19
3.6.1 การเพิ่มจำนวนยีนฮีโมแอกกลูตินินจาก cDNA โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอ เรส.....	19
3.6.2 อะกาโรสเจลอเล็กโทรโฟรีซิส.....	20
3.6.3 การสกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลโดยใช้ชุด Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit.....	20
3.7 การโคลนยีนฮีโมแอกกลูตินินเข้าในเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก.....	20
3.7.1 การเชื่อมต่อยีนฮีโมแอกกลูตินินเข้ากับเวกเตอร์สำหรับแสดงออก pPICZαA...	20
3.7.2 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์.....	21
3.7.3 การคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินินด้วยวิธี Rapid size screening.....	21
3.7.4 การสกัดพลาสมิดที่มียีนฮีโมแอกกลูตินินแทรกด้วยชุดสกัดพลาสมิด High Speed Plasmid Mini kit.....	21
3.7.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	22
3.8 การสร้างรีคอมบิแนนท์ยีสต์.....	22
3.8.1 การเตรียมคอมพีเทนต์เซลล์ของ <i>P. pastoris</i> .....	22
3.8.2 การเตรียมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดให้เป็นเส้นตรง.....	22
3.8.3 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์ยีสต์ด้วยวิธี electroporation.....	23
3.8.4 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของรีคอมบิแนนท์ยีสต์.....	23
3.8.5 การตรวจสอบชิ้นยีนฮีโมแอกกลูตินินที่แทรกในจีโนมิกดีเอ็นเอของยีสต์ โดย ใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	24



3.9 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนฮีมาแอกกลูตินิน.....	24
3.9.1 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนฮีมาแอกกลูตินิน.....	24
3.9.2 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินด้วยวิธี SDS- PAGE....	24
3.9.2.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินในอาหารเลี้ยงเซลล์..	24
3.9.2.2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินภายในเซลล์.....	24
3.9.2.3 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนโดยวิธี SDS- PAGE.....	25
3.9.2.4 การโอนถ่ายโปรตีนจากเจลไปยัง polyvinylidene fluoride (PVDF) Membrane.....	25
3.9.2.5 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินด้วยวิธี western blotting, การตรวจสอบสัญญาณด้วยวิธี Chemiluminescence และ autoradiography.....	26
3.10 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินใน รีคอมบิแนนท์ยีสต์.....	26
3.10.1 การหาความเข้มข้นของเมทานอลที่เหมาะสม.....	26
3.10.2 การหาจำนวนวันที่เหมาะสม.....	27
3.11 การทำโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินให้บริสุทธิ์.....	27
3.11.1 การขยายขนาดในการแสดงออก.....	27
3.11.2 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	27
3.12 การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนฮีมาแอกกลูตินิน.....	28
3.12.1 การทดสอบปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดง (Hemagglutination test).....	28
3.12.2 การทดสอบการตัดโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินด้วยเอนไซม์ Furin.....	28
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	29
4.1 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด.....	29
4.2 การสร้างรีคอมบิแนนท์ยีสต์.....	34
4.3 การคัดเลือกรีคอมบิแนนท์ยีสต์ในการแสดงออกของโปรตีนฮีมาแอกกลูตินิน.....	35
4.4 การศึกษาความเข้มข้นของเมทานอลและจำนวนวันที่เหมาะสมต่อการแสดงออก ของโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินในระดับขวดเขย่า.....	41
4.5 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนฮีมาแอกกลูตินิน.....	48

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	70
ข้อเสนอแนะ.....	73
รายการอ้างอิง.....	74
ภาคผนวก.....	79
ภาคผนวก ก.....	80
ภาคผนวก ข.....	83
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	90



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ชนิดและหน้าที่ของโปรตีนของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก.....	4
2.2	สายพันธุ์ปกติและสายพันธุ์กลายของ <i>P. pastoris</i> .....	12
3.1	จีโนมไทป์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง.....	16
3.2	จีโนมไทป์ของยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง.....	16
3.3	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง.....	16
3.4	เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการทดลอง.....	18
3.5	โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	19
3.6	การเตรียม SDS- PAGE สำหรับวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน.....	25

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	รูปร่างและโครงสร้างไวรัส.....	5
2.2	วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซา เอ.....	6
2.3	โครงสร้างของโปรตีนนิวรามิเนด.....	7
2.4	บริเวณที่ตัดด้วยเอนไซม์ของโปรตีน HA0 ออกเป็น HA1 และ HA2 .....	8
2.5	การเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดง.....	10
2.6	วิธีเมแทบอลิซึมของเมทานอล.....	11
3.1	พลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง.....	17
4.1	pPICZα และ ยีนฮีมแอกกลูตินินที่แพร่ระบาดรุนแรง 4 สายพันธุ์.....	30
4.2	ผลการตัดชิ้นยีนฮีมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ที่แพร่ระบาดไม่รุนแรง (LPAI) ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ.....	30
4.3	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนฮีมแอกกลูตินินที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pPICZα...	31
4.4	ลำดับของกรดอะมิโนของยีนฮีมแอกกลูตินินที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pPICZα	33
4.5	ชิ้นส่วนของยีนฮีมแอกกลูตินินสายพันธุ์ 168-2006 โคลน 18 ที่แทรกอยู่ใน จีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>P. pastoris</i> .....	34
4.6	ชิ้นส่วนของยีนฮีมแอกกลูตินินสายพันธุ์ 172-2006 โคลน 8 ที่แทรกอยู่ใน จีโนมิกดีเอ็นเอของ <i>P. pastoris</i> .....	35
4.7	ชิ้นส่วนของยีนฮีมแอกกลูตินินสายพันธุ์ LPAI โคลน 15 ที่แทรกอยู่ในจีโนมิก ดีเอ็นเอของ <i>P. pastoris</i> .....	35
4.8	อาหารเลี้ยงเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 168-2006 .....	36
4.9	อาหารเลี้ยงเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 172-2006 .....	36
4.10	อาหารเลี้ยงเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ LPAI-15.....	37
4.11	SDS-PAGE และ western blotting ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 168-2006 และ สายพันธุ์ 172- 2006 โดยใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ Histidine Tag.....	38

ภาพที่	หน้า
4.12 SDS-PAGE และ western blotting ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 168-2006, 172-2006 และ LPAI-15 โดยใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ Histidine Tag.....	38
4.13 SDS-PAGE และ western blotting ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 168-2006, 172-2006 และ LPAI-15 โดยใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนฮีโมแอกกลูตินิน.....	40
4.14 SDS-PAGE และ western blotting ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 168-2006, 172-2006 และ LPAI-15 โดยใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนฮีโมแอกกลูตินิน.....	40
4.15 SDS-PAGE และ western blotting ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ ยีสต์สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 ที่ผ่านการชักนำด้วย 1%(v/v)-5%(v/v) เมทานอล เป็นเวลา 7 วัน.....	42
4.16 SDS-PAGE และ western blotting ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ ยีสต์สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 ที่ผ่านการชักนำด้วย 4%(v/v) เมทานอล เป็นเวลา 1-7 วัน.....	43
4.17 SDS-PAGE และ western blotting ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ ยีสต์สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 ที่ผ่านการชักนำด้วย 1%(v/v)-5%(v/v) เมทานอล เป็นเวลา 7 วัน.....	44
4.18 SDS-PAGE และ western blotting ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ ยีสต์สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 ที่ผ่านการชักนำด้วย 4%(v/v) เมทานอล เป็นเวลา 1-7 วัน.....	45
4.19 SDS-PAGE และ western blotting ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ ยีสต์สายพันธุ์ LPAI-15 โคลนที่ 4 ที่ผ่านการชักนำด้วย 1%(v/v)-5%(v/v) เมทานอล เป็นเวลา 7 วัน.....	46
4.20 SDS-PAGE และ western blotting ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ ยีสต์สายพันธุ์ LPAI-15 โคลนที่ 4 ที่ผ่านการชักนำด้วย 4%(v/v) เมทานอล เป็นเวลา 1-7 วัน.....	47
4.21 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 โดยใช้ DEAE Column.....	49

ภาพที่	หน้า
4.22 SDS-PAGE และ western blotting ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ ยีสต์สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column.....	50
4.23 การเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย DEAE Column.....	51
4.24 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 โดยใช้ Sephacryl S-200 Column.....	52
4.25 SDS-PAGE และ western blotting ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ ยีสต์สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column.....	53
4.26 การเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column .....	54
4.27 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 โดยใช้ DEAE Column.....	55
4.28 SDS-PAGE และ western blotting ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ ยีสต์สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column.....	56
4.29 การเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย DEAE Column.....	57
4.30 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 โดยใช้ Sephacryl S-200 Column.....	58
4.31 SDS-PAGE และ western blotting ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ ยีสต์สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column.....	59
4.32 การเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column.....	60

ภาพที่	หน้า	
4.33	การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ LPAI-15 โคลนที่ 4 โดยใช้ DEAE Column.....	61
4.34	SDS-PAGE และ western blotting ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ ยีสต์สายพันธุ์ LPAI-15 โคลนที่ 4 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column.....	62
4.35	การเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของโปรตีนที่ผ่านการทำให้ บริสุทธิ์ด้วย DEAE Column.....	63
4.36	การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ LPAI-15 โคลนที่ 4 โดยใช้ Sephacryl S-200 Column.....	65
4.37	SDS-PAGE และ western blotting ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ ยีสต์สายพันธุ์ LPAI-15 โคลนที่ 4 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column.....	66
4.38	การเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของโปรตีนที่ผ่านการทำให้ บริสุทธิ์ด้วย DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column.....	67
4.39	SDS-PAGE และ western blotting ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ ยีสต์ที่นำมาทดสอบการถูกตัดด้วยเอนไซม์ Furin หลังจากทำให้บริสุทธิ์โดย ผ่าน DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column.....	68
4.40	SDS-PAGE และ western blotting ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ ยีสต์ที่นำมาทดสอบการถูกตัดด้วยเอนไซม์ Furin หลังจากทำให้บริสุทธิ์โดย ผ่าน DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column.....	69

**คำอธิบายคำย่อและสัญลักษณ์**

APS	=	ammonium persulfate
bp	=	base pair
cDNA	=	complementary DNA
EDTA	=	ethylenediaminetetra acetic acid
HRP	=	horse radish peroxidase
kb	=	kilobase
kDa	=	kilodalton
mM	=	millimolar
PBS	=	phosphate buffer saline
PBST	=	phosphate buffer saline-Tween 20
PVDF	=	polyvinylidene fluoride
SDS-PAGE	=	sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
v/v	=	volume/volume
w/v	=	weight/volume

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยมีการส่งออกสินค้าและผลิตภัณฑ์สัตว์ปีกเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งไก่ ซึ่งสร้างรายได้จำนวนมากให้กับประเทศ ในปี พ.ศ.2552 ประเทศไทยมีมูลค่าการส่งออกสินค้าทั้งหมด 5,196,970 ล้านบาท โดยเป็นสินค้าประเภทผลิตภัณฑ์จากเนื้อไก่ มูลค่า 49,039 ล้านบาท เมื่อเปรียบเทียบมูลค่าการส่งออกสินค้าของผลิตภัณฑ์จากเนื้อไก่ตั้งแต่ปี พ.ศ.2550-2552 พบว่ามูลค่าการส่งออกมีแนวโน้มสูงขึ้น และในปี พ.ศ.2553-2554 ได้คาดการณ์ว่าการส่งออกสินค้าและผลิตภัณฑ์จากเนื้อไก่จะมีการขยายตัวเพิ่มขึ้น เนื่องจากระดับราคาอยู่ในเกณฑ์ดี (ศูนย์สารสนเทศการเกษตร, 2552)

โรคไข้หวัดนกเป็นโรคระบาดที่ระบาดในหมู่นกสัตว์ปีกมาเป็นเวลานานแล้ว การป้องกันและเฝ้าระวังโรคระบาดในสัตว์ปีก รวมถึงไก่ จึงมีความสำคัญมาก ซึ่งในอดีตโรคนี้จะเกิดการระบาดในสัตว์ปีกและส่งผลให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจเท่านั้น แต่ทว่าปัจจุบันโรคนี้สามารถติดต่อสู่มนุษย์ และทำให้ผู้ที่ได้รับเชื้อถึงขั้นเสียชีวิตได้ โดยในปี พ.ศ.2540 มีการแพร่ระบาดของโรคไข้หวัดนกสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูง (High Pathogenic Avian Influenza, HPAI) มาสู่คนครั้งแรกในประเทศฮ่องกง โดยพบผู้ป่วยติดเชื้อ 18 ราย และเสียชีวิต 6 ราย คิดเป็นอัตราการตายร้อยละ 33 ของผู้ป่วยทั้งหมดและได้รับการพิสูจน์แล้วว่าติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ ชนิดเอสายพันธุ์ H5N1 (Hu และคณะ, 2006) ในประเทศไทย พบการระบาดของไวรัสชนิดนี้เป็นครั้งแรกเมื่อเดือนมกราคม พ.ศ.2547 ทำให้มีนกมากกว่า 62 ล้านตัวถูกกำจัด และพบผู้ติดเชื้อจำนวน 17 ราย และเสียชีวิต 12 ราย (Tiensin และคณะ, 2005) ในปัจจุบันแม้ไม่มีการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสดังกล่าว แต่ยังคงต้องเฝ้าระวัง ทางเลือกหนึ่งในการป้องกันการแพร่ระบาด คือ การหายาด้านการติดเชื้อไวรัสชนิดใหม่ ๆ และ การสร้างชุดตรวจสอบไวรัสที่สามารถวิเคราะห์ผลอย่างรวดเร็ว ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้อนุภาคไวรัสโดยตรง ซึ่งเป็นอันตรายสูง ปัจจุบันจึงมีการนำเทคนิคทางอณูพันธุวิศวกรรมศาสตร์ มาใช้ในการศึกษาและประยุกต์ใช้ในงานชีววิทยาระดับโมเลกุลของโปรตีนต่าง ๆ ของไวรัสที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ ซึ่งโปรตีนฮีมาแกลกูลินิน (Hemagglutinin) เป็นโปรตีนหนึ่งที่มีความสำคัญในการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส โดยจับกับตัวรับของเซลล์เป้าหมาย ซึ่งเป็นกระบวนการเริ่มต้นในการจำลองตัวเองของไวรัส

งานวิจัยนี้ได้ทำการโคลน แยก และศึกษาสมบัติของโปรตีนฮีโมแอกกลูตินินจากเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (H5N1) ในยีสต์ *Pichia pastoris* เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนฮีโมแอกกลูตินินของเชื้อไวรัส

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

โคลน แยก และศึกษาสมบัติของโปรตีนฮีโมแอกกลูตินินจากเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (H5N1) ใน *P. pastoris* เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนฮีโมแอกกลูตินินของเชื้อไวรัส ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตวัคซีน การพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัส รวมทั้งการพัฒนาต่อต้านไวรัสในการป้องกันการติดเชื้อ และ/หรือ การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เนื่องจากเชื้อไวรัสไข้หวัดนก (H5N1) สามารถแพร่กระจายได้ในอากาศ จึงมีความจำเป็นต้องปฏิบัติในห้องปฏิบัติการ Biosafety Class 3 ดังนั้น การโคลน แยก และศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนฮีโมแอกกลูตินินจากเชื้อไวรัสไข้หวัดนกใน *P. pastoris* สามารถนำไปพัฒนาให้ใช้ในห้องปฏิบัติการปกติได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตวัคซีน การพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัส รวมทั้งการพัฒนาต่อต้านไวรัสในการป้องกันการติดเชื้อ และ/หรือ การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส อาทิเช่น สารสกัดสมุนไพรธรรมชาติ หรือ สารเคมีสังเคราะห์ เป็นต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 2 ปรีทรศน์วรรณกรรม

### 2.1 เชื้อไวรัสไข้หวัดนก

เชื้อไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N1 (Avian Influenza A virus H5N1) เป็นเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคไข้หวัดนก (Avian flu) ในสัตว์ปีก ซึ่งเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สร้างรายได้จำนวนมากให้กับประเทศ นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดปัญหาทางสุขภาพของมนุษย์ (Hu และคณะ, 2006) เชื้อไวรัสชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซา เอ (Influenza A) ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคไข้หวัดใหญ่ในมนุษย์

เชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่เริ่มแพร่ระบาดครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ.2461 มีสาเหตุจากเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซา เอ สายพันธุ์ H1N1 หรือ “Spanish flu” ส่งผลให้มีผู้ป่วยเสียชีวิตประมาณ 10,000 คนต่อสัปดาห์ (Taubenberger, 2001) ต่อมาในช่วงปี พ.ศ.2500-2501 ได้มีการระบาดรุนแรงของเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซา เอ สายพันธุ์ H2N2 หรือ “Asian flu” ในประเทศจีน และ ตามมาด้วยการระบาดรุนแรงในประเทศฮ่องกงในช่วงปี พ.ศ.2511-2512 เกิดจากเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซาสายพันธุ์ H3N2 หรือ “Hong Kong flu” (Johansson และ Brett, 2007) และ ในปี พ.ศ.2540 มีการพบการระบาดครั้งแรกของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในประเทศฮ่องกง ส่งผลให้ไก่ในประเทศฮ่องกงตายเป็นจำนวนมาก และมีรายงานพบผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสดังกล่าว เมื่อตรวจลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในผู้ป่วย พบว่ามีความใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่แยกได้จากไก่ (Bender และคณะ, 1999) จากรายงานดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า เชื้อไวรัสไข้หวัดนกสามารถแพร่จากสัตว์ปีกมาสู่คนได้ ประเทศไทยพบการระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 ส่งผลให้นกจำนวน 62 ล้านตัวถูกกำจัด และพบผู้ป่วยจำนวน 17 รายติดเชื้อ และเสียชีวิต 12 ราย (Tiensin และคณะ, 2005) ซึ่งเชื้อไวรัสดังกล่าวส่งผลเสียต่อสุขภาพของประชาชนเป็นอย่างมาก

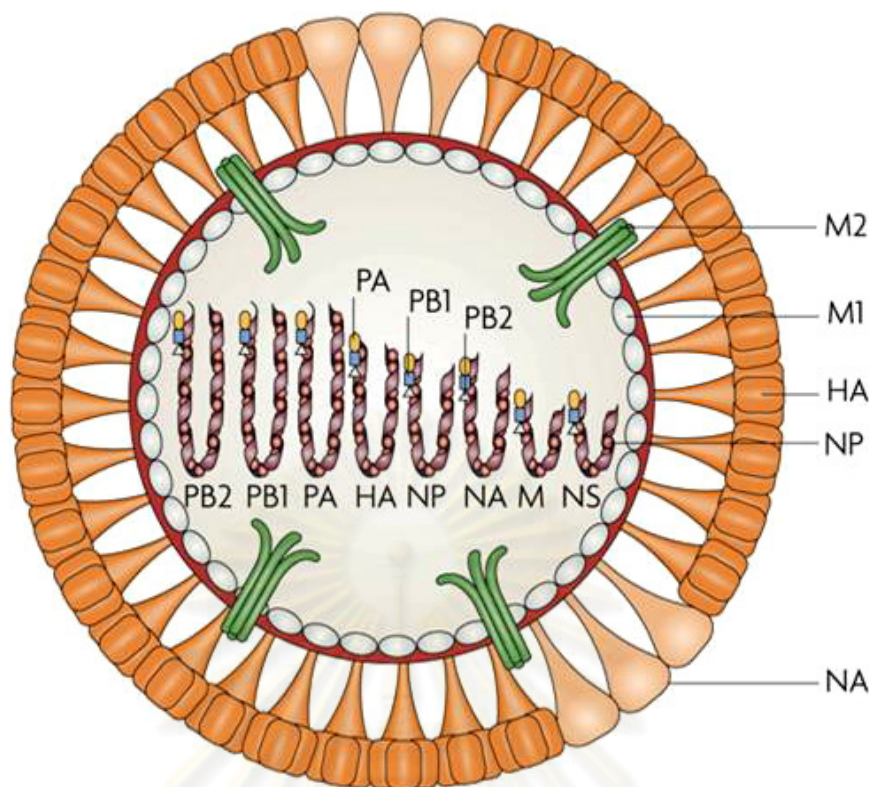
## 2.2 ลักษณะของเชื้อไวรัสไข้หวัดนก

เชื้อไวรัสไข้หวัดนก ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซา เอ วงศ์ *Orthomyxoviridae* มีสารพันธุกรรมเป็น RNA สายเดี่ยว สายลบ (negative single-stranded RNA segments) จำนวน 8 ท่อน สามารถผลิตโปรตีนของไวรัส 11 ชนิด (ตารางที่ 2.1) (Subbarao และ Joseph, 2007) อนุภาคของไวรัส (รูปที่ 2.1) มีเปลือกหุ้ม (envelope) ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นทรงกลม และมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 100 นาโนเมตร บางครั้งพบรูปร่างเป็นเส้นสาย (filamentous form) บริเวณผิวด้านนอกจะมี glycoprotein spike 2 ชนิด คือ ฮีมาแอกกลูทีนิน (HA) และนิวรามินิเดส (NA) (White และคณะ, 1994) โดยมีอัตราส่วนของ HA : NA อยู่ระหว่าง 4-5 : 1 (Knipe และคณะ, 2001) ในปัจจุบันมีการจำแนก HA 16 ชนิด ได้แก่ H1-H16 และ NA 9 ชนิด ได้แก่ N1-N9 (Subbarao และ Joseph, 2007) โดยใช้การทดสอบด้วยวิธี Hemagglutinin inhibition test ร่วมกับ Neuraminidase inhibition test (Lee และคณะ, 2001)

ตารางที่ 2.1 ชนิดและหน้าที่ของโปรตีนของเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซา เอ

(Subbarao และ Joseph, 2007)

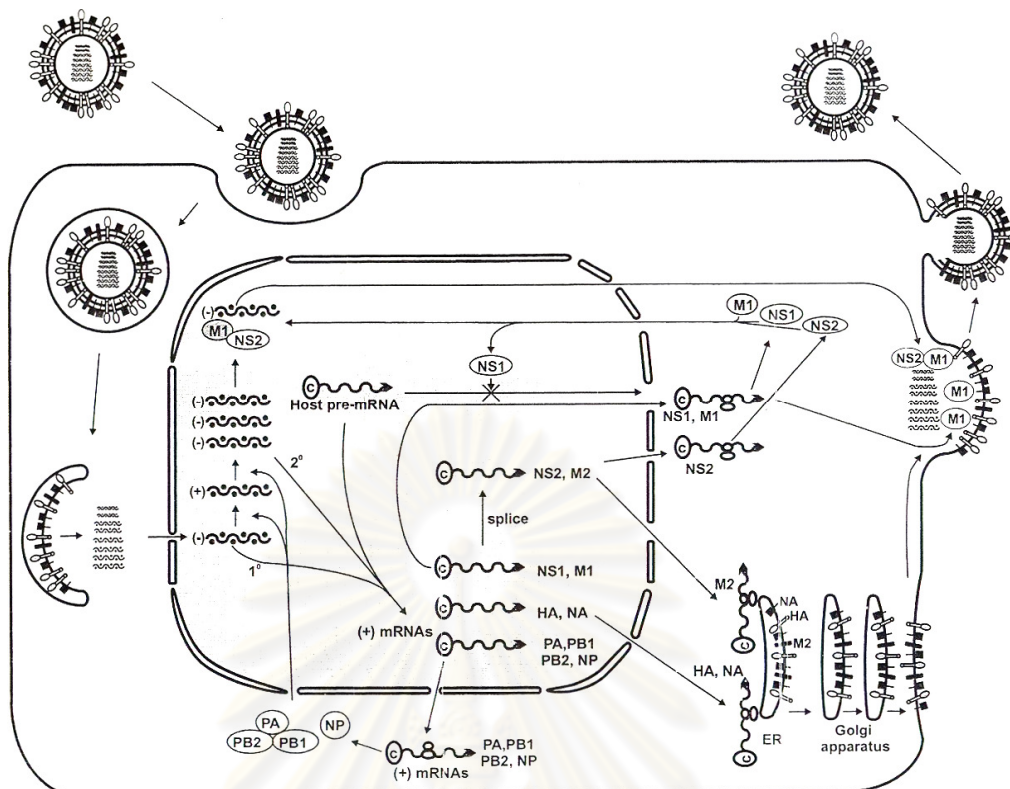
Segment	Encode proteins	Protein function
1	PB2	Polymerase subunit; mRNA cap recognition
2	PB1	Polymerase subunit; RNA elongation, endonuclease activity
	PB1-F2	Pro-apoptotic activity
3	PA	Polymerase subunit; Protease activity
4	HA	Surface glycoprotein; major antigen, receptor binding and fusion activities
5	NP	RNA binding protein; nuclear import regulation
6	NA	Surface glycoprotein; sialidase activity, virus release
7	M1	Matrix protein ; vRNP interaction, RNA nuclear export regulation, viral budding
	M2	Ion channel; virus uncoating and assembly
8	NS1	Interferon antagonist protein; regulation of host gene expression
	NEP/NS2	Nuclear export of RNA



รูปที่ 2.1 รูปร่างและโครงสร้างไวรัส (Subbarao และ Joseph, 2007)

### 2.3 วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซา เอ (Bouvier และ Palese, 2008)

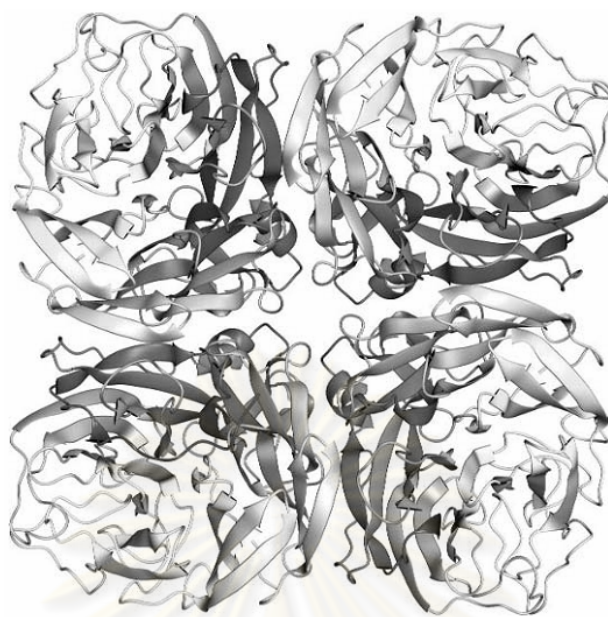
วงจรชีวิตของเชื้อไวรัส (รูปที่ 2.2) เริ่มจากการที่โปรตีนฮีมาแอกกลูตินิน (HA) ที่อยู่บนผิวอนุภาคของไวรัสเข้าจับกับตัวรับของเชื้อไวรัสที่อยู่บนผิวเซลล์เจ้าบ้าน คือ กรดไซลิก ( $\alpha$  2,3-linked หรือ  $\alpha$  2,6-linked sialic acid) โดยอนุภาคไวรัสจะเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี Endocytosis ในลักษณะของ endosome จากนั้นภายใน endosome จะมีค่า pH ลดลง ประมาณ 5-6 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีน HA ก่อให้เกิดการรวมกันของ viral envelope และ endosomal membrane ซึ่งสามารถปลดปล่อยสารพันธุกรรมออกมาสู่ไซโตพลาสซึม และนำสารพันธุกรรมเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์เจ้าบ้าน เพื่อเข้าสู่กระบวนการจำลองตัวเอง ในระยะสุดท้ายจะมีการรวมตัวกันของสารพันธุกรรมทั้ง 8 สายเข้ากับโปรตีนโครงสร้าง เพื่อที่จะปล่อยอนุภาคไวรัสออกจากเซลล์เจ้าบ้านด้วยการ budding



รูปที่ 2.2 วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซา เอ (Knipe และคณะ, 2001)

#### 2.4 โปรตีนนิวรามินิเดส (Neuraminidase, NA)

โปรตีนนิวรามินิเดส เป็นโปรตีนที่ถูกถอดรหัสจากสารพันธุกรรมก่อนที่ 6 เริ่มแรกโปรตีนดังกล่าวจะถูกสังเคราะห์ในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม จากนั้นจะเกิดการม้วนพับ (folding) และเกิดการรวมกันของโปรตีนนิวรามินิเดสในบริเวณดังกล่าว ต่อมาจะถูกส่งไปที่บริเวณ Golgi complex และสุดท้ายจะถูกส่งไปที่บริเวณของ plasma membrane เพื่อให้เป็นองค์ประกอบของอนุภาคไวรัสรุ่นใหม่ต่อไป (Hausmann และคณะ, 1997) โดยโครงสร้างของโปรตีนนิวรามินิเดส (รูป 2.3) เป็นแบบ homotetramer แต่ละ monomer มีลักษณะคล้ายดอกเห็ด ประกอบด้วย cytoplasmic tail, transmembrane domain, stalk region และ globular head (Sastre และ Palese, 1995) โปรตีนส่วน globular head มีสมบัติเป็นเอนไซม์ sialidase ใช้ในการแยก sialic acid ออกจากโปรตีนฮีมแอกกลูตินิน ขณะที่ไวรัสกำลังออกนอกเซลล์เจ้าบ้าน และช่วยกำจัด decoy receptors บนเยื่อเมือก cilia และ cellular glycoocalyx ทำให้ไวรัสจับเกาะกับเซลล์เป้าหมายได้จำเพาะมากยิ่งขึ้น (Ohuchi และคณะ, 2006; Sylte และคณะ, 2007) นอกจากนี้โปรตีนชนิดนี้เป็นแอนติเจนที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งในการกระตุ้นให้ร่างกายสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะ เพื่อช่วยในการป้องกันการติดเชื้อไวรัส (ภาวพันธ์ ภัทรโกศล และคณะ, 2549)



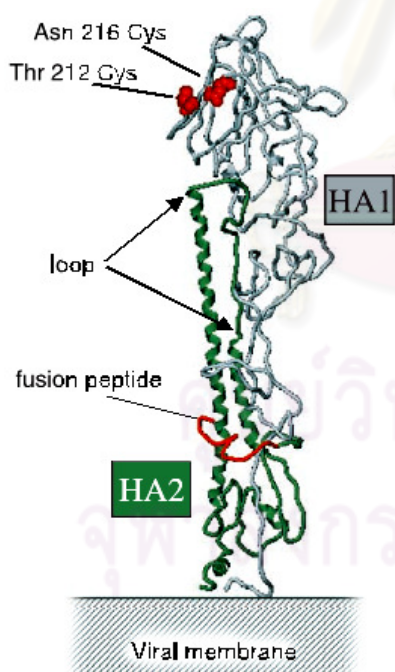
รูปที่ 2.3 โครงสร้างของโปรตีนนิวรามิനിเดส (German และ Laver, 2005)

## 2.5 โปรตีนฮีมาแอกกลูทีนิน (Hemagglutinin, HA)

โปรตีนฮีมาแอกกลูทีนิน เป็นโปรตีนที่ถูกถอดรหัสจากสารพันธุกรรมก่อนที่ 4 ที่เรียกชื่อว่า ฮีมาแอกกลูทีนิน (Hemagglutinin) นั้น เพราะโปรตีนดังกล่าวสามารถจับเกาะกับเม็ดเลือดแดงได้ เริ่มแรกโปรตีนฮีมาแอกกลูทีนินจะถูกผลิตออกมาเป็นโปรตีนสายยาว เรียกว่า HA0 ในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม จากนั้นจะถูกส่งออกไปที่บริเวณผิวของเซลล์ผ่านทาง golgi network ซึ่งบริเวณดังกล่าวโปรตีน HA0 จะถูกตัด (cleave) ออกเป็น HA1 และ HA2 (รูปที่ 2.4) โดยเอนไซม์จากเซลล์เจ้าบ้าน (Stevens และคณะ, 2006) ลำดับกรดอะมิโนบริเวณที่ตัดด้วยเอนไซม์ของโปรตีน HA (cleavage site) ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved amino acid) มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงในการระบาดของเชื้อ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบริเวณดังกล่าวส่งผลให้ความรุนแรงในการระบาดของเชื้อไวรัสเปลี่ยนแปลงไป (Wagner และคณะ, 2001; Hu และคณะ, 2006)

โปรตีน HA1 จะมีส่วนของ sialic acid binding pocket ทำหน้าที่ในการจับกับเซลล์เจ้าบ้านในการเริ่มต้นกระบวนการเพิ่มจำนวนของไวรัส และเป็นแอนติเจนหลักที่สำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Luo และคณะ, 1997) ส่วนโปรตีน HA2 จะมีส่วนของ fusion peptide ซึ่งหลังจากที่ไวรัสได้เข้าจับ sialic acid receptor บนผิวของเซลล์เจ้าบ้านและเคลื่อนเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี

endocytosis จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของ pH ใน endosome ให้ลดลงจนถึง pH ประมาณ 5-6 ซึ่งชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างตรงบริเวณ N-terminal ของ fusion peptide ส่งผลให้เกิดการรวมกันของ viral และ endosomal membrane ทำให้เกิดกระบวนการถอดเปลือกหุ้ม และปลดปล่อยสารพันธุกรรมออกมา (Skehel และคณะ, 2000) ซึ่งขั้นตอนดังกล่าวเป็นขั้นตอนที่สำคัญมาก เนื่องจากถ้าขั้นตอนนี้ไม่เกิดขึ้น ส่งผลให้ไวรัสไม่สามารถเกิดกระบวนการจำลองตัวเองได้ ดังนั้น Luo และคณะ (1997) ได้ศึกษาการยับยั้งการ fusion ของ viral envelope และ endosomal membrane พบว่าสารประกอบ BMY-27709 ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ *tert*-butyl hydroquinone (TBHQ) สามารถยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของ โครงสร้างของ HA2 บริเวณ fusion peptide ได้ส่งผลให้ไม่เกิดการรวมตัวกันของ endosomal membrane และ viral membrane ส่งผลให้เชื้อไวรัสไม่สามารถเกิดกระบวนการจำลองตัวเองได้ ในปี 2008 Russell และคณะ ได้ศึกษาการเข้าจับของ *tert*-butyl hydroquinone (TBHQ) พบว่า TBHQ จะเข้าจับตรงบริเวณ hydrophobic pocket ระหว่าง HA monomers ซึ่งการจับของ TBHQ นั้นส่งผลให้ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ HA2 เมื่ออยู่ในสภาวะ fusion pH (pH ประมาณ 5-6) ซึ่งจากการศึกษานี้สามารถนำไปต่อยอดพัฒนาเป็นยาต้านไวรัสได้



รูปที่ 2.4 บริเวณที่ตัดด้วยเอนไซม์ของโปรตีน HA0 ออกเป็น HA1 และ HA2

สีเทา = HA1

สีเขียว = HA2

สีแดง = บริเวณที่ตัดด้วยเอนไซม์

(Huang และคณะ, 2003)



## 2.6 ความรุนแรงของไวรัส (Viral virulence) (ภาวพันธ์ ภัทรโกศล และคณะ, 2549)

จากการศึกษาความรุนแรงของเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซา พบว่า การที่โมเลกุลตั้งต้นของโปรตีน HA (HA0) ถูกตัดด้วยเอนไซม์ออกเป็น HA1 และ HA2 มีความสำคัญมาก เพราะเกี่ยวข้องกับความสามารถในการเข้าสู่เซลล์ โมเลกุลของ HA ที่บริเวณที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ (cleavage site) จะมีลำดับการเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโน 2 แบบ คือ Q(E)-X-R และ R-X-K/R-R (Q = glutamine, E = glutamic acid, X = any amino acid, K = lysine และ R = arginine) ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะที่จะถูกตัดด้วยเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ได้ โดยแบบแรกนั้นเป็น HA ของเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่คน (H1, H2, H3) และของไวรัสไข้หวัดนกชนิดที่ความรุนแรงในการก่อโรคต่ำ (Low Pathogenic Avian Influenza, LPAI) เช่น HA<sub>1</sub>-PSIQVR-GL-HA<sub>2</sub> สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ในกลุ่มทริปซิน (trypsin) ซึ่งหลังจากเซลล์เยื่อบริเวณทางเดินหายใจ การตัดนี้มีความจำเพาะสูงทำให้ไวรัสมีข้อจำกัด กล่าวคือ เชื้อไวรัสไม่สามารถกระจายไปสู่เซลล์ชนิดอื่นที่ไม่มีเอนไซม์ในกลุ่มทริปซิน ส่งผลทำให้สายพันธุ์ดังกล่าวมีความรุนแรงในการก่อโรคต่ำ แต่ในไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูง (High Pathogenic Avian Influenza, HPAI) พบว่ามีบริเวณ cleavage site ในแบบที่สอง คือ มีกรดอะมิโนที่มีประจุบวกหลายตัวต่อเรียงกัน (polybasic cleavage site) ตัวอย่างเช่น HA<sub>1</sub>-KKREKR-GL-HA<sub>2</sub> ซึ่งลักษณะ cleavage site ดังกล่าวสามารถตัดด้วยเอนไซม์ furin ซึ่งเป็น protease enzyme ที่อยู่ใน trans-golgi network พบได้ในทุกเซลล์ของร่างกาย ทำให้ไวรัสสามารถเข้าเจริญในเซลล์หลากหลายชนิดทั่วร่างกาย ทำให้ไวรัสที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูง นอกจากนี้ยังมีการพบไวรัส H5N1 ซึ่งมี furin recognition motif อยู่ แต่มีความรุนแรงในการก่อโรคต่ำ เมื่อนำมาศึกษาในระดับโมเลกุลพบว่าไวรัสดังกล่าวที่โมเลกุลของ HA มีสาย oligosaccharides อยู่ใกล้กับบริเวณที่จะถูกเอนไซม์ตัด มีผลรบกวนการตัดของโมเลกุล ทำให้กลายเป็นสายพันธุ์ที่ไม่รุนแรงไป ในสายพันธุ์อื่นของ H5 ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูง ไม่พบว่ามีสาย oligosaccharides นี้อยู่เลย

อีกกลไกหนึ่งของไวรัส คือ การศึกษาความรุนแรงของไวรัสอินฟลูเอนซา เอ สายพันธุ์ H5N1 สายพันธุ์ที่มีความรุนแรงสูง พบว่าโปรตีน NS1 ของสายพันธุ์ดังกล่าวมีความสามารถในการหลบหลีกภาวะภูมิคุ้มกัน ตามปกติเมื่อไวรัสเข้าสู่ร่างกายจะกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดเป็นด่านแรก คือ การสร้าง interferon และ tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) เพื่อทำลายไวรัส แต่พบว่าถ้าโปรตีน NS1 ที่มีกรดอะมิโนชนิด glutamic acid ในตำแหน่งที่ 92 จะช่วยป้องกันมิให้เซลล์ติดเชื้อถูกทำลายด้วย cytokine ดังกล่าวทำให้ไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนและแพร่กระจายไปส่วนต่าง ๆ ของร่างกายได้ (Bergmann และคณะ, 2000)

## 2.7 การเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดง (Hemagglutination test)

โปรตีนฮีมาแอกกลูตินิน เป็นโปรตีนที่อยู่บนผิวของอนุภาคไวรัสอินฟลูเอนซา โดยโปรตีนดังกล่าวถูกตัดออกเป็น 2 ส่วนจากโปรตีน HA0 คือ HA1 และ HA2 โดยในส่วนของ HA1 จะทำหน้าที่ในการเข้าจับกับบริเวณ sialic acid receptor เป็นตัวรับบนผิวเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่ง sialic acid receptor ( $\alpha$ 2,3-linked หรือ  $\alpha$ 2,6-linked sialic acid) โดยตัวรับดังกล่าวอยู่ที่ผิวของเซลล์เยื่อเมือกบริเวณทางเดินหายใจ นอกจากนี้ ตัวรับดังกล่าวสามารถพบได้บนผิวของเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินที่อยู่บนผิวของอนุภาคของเชื้อไวรัส สามารถเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์บางชนิดได้ (รูปที่ 2.5) จากสมบัติของเม็ดเลือดแดงที่มี sialic acid receptor จึงถูกนำมาใช้ในการวินิจฉัยเบื้องต้น (Puthavathana, 2005)



รูปที่ 2.5 การเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดง

(ดัดแปลงจาก Dulyachai และคณะ, 2010)

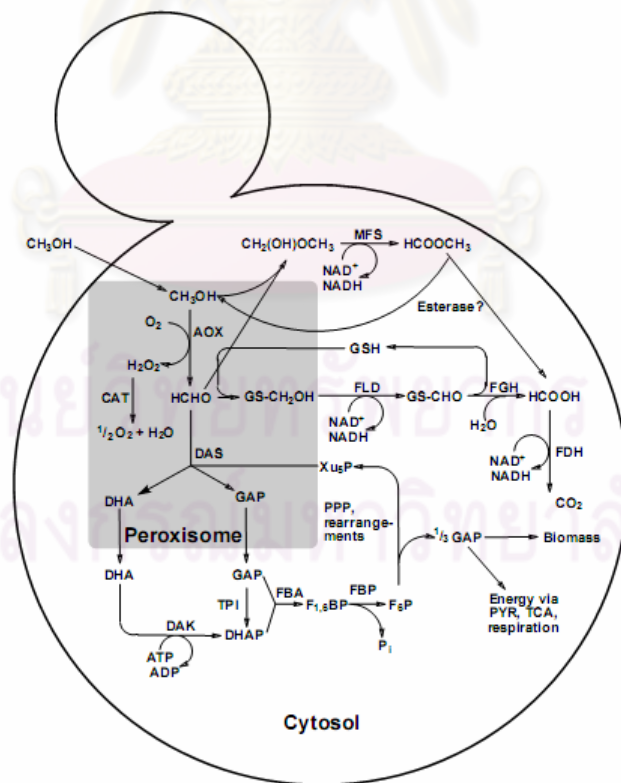
ภาพถ่าย ผลบวก นั่นคือ สามารถเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงได้  
ภาพขวา ผลลบ นั่นคือ ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงได้

## 2.8 *Pichia pastoris*

ยีสต์กลุ่ม Methylotrophic เป็นยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนในการดำรงชีวิต สายพันธุ์ที่นิยมใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน คือ *P. pastoris* และ *Hansenula polymorpha* (*P. angusta*) ซึ่งยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์นี้มีความแตกต่างกัน โดย *P. pastoris* จะสร้างเอนไซม์ alcohol oxidase จำนวน 2 ชนิด คือ AOX1 และ AOX2 ในขณะที่ *H. polymorpha* จะผลิตเอนไซม์ alcohol oxidase เพียงชนิดเดียว คือ MOX (Porro และคณะ, 2005) อย่างไรก็ตาม *P. pastoris* เป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เนื่องจากสามารถผลิตเซลล์ได้ในปริมาณมาก และสามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Cregg, 2007)

2.8.1 เมแทบอลิซึมของเมทานอล (Methanol metabolism)

*P. pastoris* เป็นยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน แหล่งพลังงาน และใช้ alkylated amine เป็นแหล่งไนโตรเจน ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเมทานอล จะสร้างสารอินทรีย์เดี่ยวที่เป็นพิษต่อเซลล์ นั่นคือฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) ซึ่งเกิดจากเอนไซม์ alcohol oxidase ในเมแทบอลิซึมเมทานอล และเอนไซม์ amine oxidase ในเมแทบอลิซึมเอมีน (Sunga และ Cregg, 2004) (รูปที่ 2.6) จากนั้นฟอร์มัลดีไฮด์จะถูกลำเลียงเข้าสู่ cytosol โดยฟอร์มัลดีไฮด์ทรานส์เฟอร์ไรนจะถูกออกซิไดซ์ เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ ด้วยเอนไซม์ formaldehyde dehydrogenase (FLD), s-formylglutathione hydrolase (FGH), formate dehydrogenase (FDH), และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิถี xylulose-5-phosphate ยกเว้น DHAS (dihydroxyacetone synthase) สุดท้ายจะได้สารอินทรีย์เดี่ยวต่างๆ ที่จำเป็นในการดำรงชีวิตในการผลิตมวลชีวภาพของเซลล์ (cell biomass) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้ภายในเซลล์ยังมีการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์เช่นเดียวกัน ดังนั้น เพื่อหลีกเลี่ยงความเป็นพิษดังกล่าว เซลล์จึงสร้างโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่า peroxisome ซึ่งจะเป็นโครงสร้างที่เปลี่ยน ( $H_2O_2$ ) เป็นสารชนิดอื่นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์



รูปที่ 2.6 วิธีเมแทบอลิซึมของเมทานอล (Hartner และ Glieder, 2006)

## 2.8.2 สายพันธุ์ของยีสต์ *P.pastoris*

*P. pastoris* สายพันธุ์ปกติคือ Y-11430 จาก Northern Regional Research Laboratories (NRRL; Peoria, IL) และ X-33 (Invitrogen) ซึ่งเมื่อทำการผลิตสายพันธุ์ กลายแล้วจะสามารถแยกได้เป็น 2 ประเภท คือ Auxotrophic strains และ Protease-deficient strains (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.2 สายพันธุ์ปกติและบางสายพันธุ์กลายของ *P. pastoris*

Strain	Genotype
X-33	Wild type
Y-11430	Wild type
<b>Auxotrophic strains</b>	
GS115	<i>his4</i>
GS190	<i>arg4</i>
GS200	<i>arg4his4</i>
JC220	<i>ade1</i>
JC227	<i>ade1arg4</i>
JC254	<i>ura3</i>
KM71	<i>his4arg4aox1Δ::ScARG4</i>
YJN165	<i>ura5</i>
<b>Protease-deficient strains</b>	
SMD1163	<i>pep4prb1his4</i>
SMD1165	<i>prb1his4</i>
SMD1168	<i>his4 Δpep4::URA3ura3</i>
SMD1168 <i>kex1::SUC2</i>	<i>Δpep4::URA3Δkex1::SUC2his4ura3</i>
<b>Other strains</b>	
GS241	<i>fld1</i>
MS105	<i>his4fld1</i>

### 2.8.3 เวกเตอร์แสดงออกของ *P.pastoris*

เวกเตอร์ที่นิยมใช้กับ *P. pastoris* จะมีด้วยกัน 2 ชนิด คือ เวกเตอร์ที่สร้างโปรตีนแล้วเก็บไว้ในเซลล์ (intracellular protein) และเวกเตอร์ที่สร้างโปรตีนแล้วหลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์ (secreted protein) โดยในเวกเตอร์จะประกอบด้วยส่วนของ multiple cloning site, promoter สำหรับยีน AOX 1 ในการสร้างเอนไซม์ alcohol oxidase, origin of replication และ selectable marker สำหรับเวกเตอร์ที่ใช้กับ secreted protein จะต้องมีส่วนของ secretion signal ด้วย เพื่อให้โปรตีนที่ผลิตออกมาได้นั้นสามารถหลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์ (Li และคณะ, 2007; Cregg, 2007)

ข้อดีของการใช้ยีสต์ *P. pastoris* เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนมีดังนี้ (Cereghino และคณะ, 2002; Mayson และคณะ, 2003)

1. สามารถผลิตโปรตีนได้ในระดับสูงทั้งแบบผลิตภายในเซลล์ และหลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์
2. มีกระบวนการ post-translation modification ตัวอย่างเช่น การเกิด glycosylation, disulfide bond formation และ proteolytic processing
3. มีความเสถียรทางพันธุกรรม (stability of genetics) เมื่อมีการรวมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าไปในโครโมโซมของยีสต์
4. สามารถเพาะเลี้ยงในระดับถังหมักและมีการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว สามารถผลิต biomass ได้ในระดับสูง และ ต้นทุนในการเพาะเลี้ยงต่ำ
5. *Pichia* เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตโปรตีนอื่น ๆ น้อย จึงง่ายต่อการทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์

จากข้อดีของ *P. pastoris* ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน งานวิจัยชิ้นนี้จึงทำการศึกษาการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนฮีโมแอกกลูตินินในยีสต์ *P. pastoris*

## 2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Saelens และคณะ (1999) ได้โคลนยีนฮีโมแอกกลูทินินของไวรัสอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H3N2 เข้าสู่ยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ GS115 และทำการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนฮีโมแอกกลูทินินด้วย 2%(v/v) เมทานอล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าโปรตีนถูกผลิตและหลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์ ต่อมาทำการวิเคราะห์การแสดงออกด้วยวิธี SDS-PAGE และ western blot พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนมีขนาดประมาณ 75-78 กิโลดาลตัน เมื่อทำการวิเคราะห์ N-linked glycans พบว่าเกิดกระบวนการ glycosylation และมี glycans ประมาณ 10-12 glycosyl residues

Hu และคณะ (2006) ได้ทำการโคลนยีนฮีโมแอกกลูทินินของไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N2 แล้วทำการแสดงออกโดยใช้ baculovirus expression system และใช้ Sf-9 insect cells เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการแสดงออก พบว่าเป็นโปรตีนที่ถูกผลิตขึ้นภายในเซลล์ เมื่อทำการวิเคราะห์การแสดงออกด้วยวิธี SDS-PAGE และ western blot พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนมีขนาด 79 กิโลดาลตันและ 46 กิโลดาลตัน จากนั้นทำการทดสอบ detergents ต่าง ๆ และเวลาที่ใช้ในการบ่ม พบว่าการใช้ 1% Triton X-100 และ 1% Tween 20 จากนั้นบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 ชั่วโมงจะทำให้การสกัดรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกจากเซลล์ได้ดีมากยิ่งขึ้น

Wang และคณะ (2007) ได้โคลนยีนฮีโมแอกกลูทินินของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N2 เข้าสู่พลาสมิด pPICZαA จากนั้นทรานส์ฟอร์มเข้าสู่ *P. pastoris* สายพันธุ์ GS115 และทำการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนฮีโมแอกกลูทินินด้วย 0.5%(v/v) เมทานอล เป็นเวลา 4-5 วัน พบว่าโปรตีนถูกผลิตขึ้นและเก็บไว้ในเซลล์ยีสต์ เมื่อทำการวิเคราะห์การแสดงออกด้วยวิธี SDS-PAGE และ western blot พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนมีขนาด 69 กิโลดาลตันและขนาด 47 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นส่วนของ HA0 และ HA1 ตามลำดับ รีคอมบิแนนท์โปรตีนดังกล่าวสามารถที่จะนำไปใช้ในการพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบไวรัสหรือใช้ในการผลิตวัคซีนต่อไป

Witoonsatian และคณะ (2007) ได้โคลนยีนฮีโมแอกกลูทินินจากไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N1 และใช้ระบบการแสดงออก baculovirus ในการแสดงออกของโปรตีนฮีโมแอกกลูทินิน พบว่าเมื่อทำการวิเคราะห์การแสดงออกด้วยวิธี SDS-PAGE และ western blot พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้มีขนาดประมาณ 65 กิโลดาลตันและสามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบไวรัสและพัฒนาเป็นวัคซีนต่อไป

Biesova และคณะ (2009) ทำการโคลนยีนฮีมาแอกกลูตินินจากไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N1 รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้ทำการทรานส์ฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* พบว่าโปรตีนที่ได้ถูกสร้างใน inclusion bodies เมื่อทำการวิเคราะห์การแสดงผลด้วยวิธี SDS-PAGE และ western blot พบว่ามีขนาดประมาณ 60 กิโลดาลตัน และทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนู จากนั้นนำซีรัมมาทดสอบด้วยวิธี Hemagglutination inhibition test (HI) พบว่า 80% ของหนูที่ได้รับการกระตุ้น มีค่า HI titer  $\geq 40$  เมื่อทำการทดสอบกับ Vietnam H5 influenza virus



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

#### 3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

##### 3.1.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรียและจีโนมไทป์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 จีโนมไทป์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรีย	จีโนมไทป์
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>

##### 3.1.2 ยีสต์

ยีสต์และจีโนมไทป์ของยีสต์ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 จีโนมไทป์ของยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง

ยีสต์	จีโนมไทป์
<i>Pichia pastoris</i> KM 71	<i>arg 4, his 4, aox 1::Arg 4</i>

#### 3.2 ไพรมเมอร์

ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 3.3

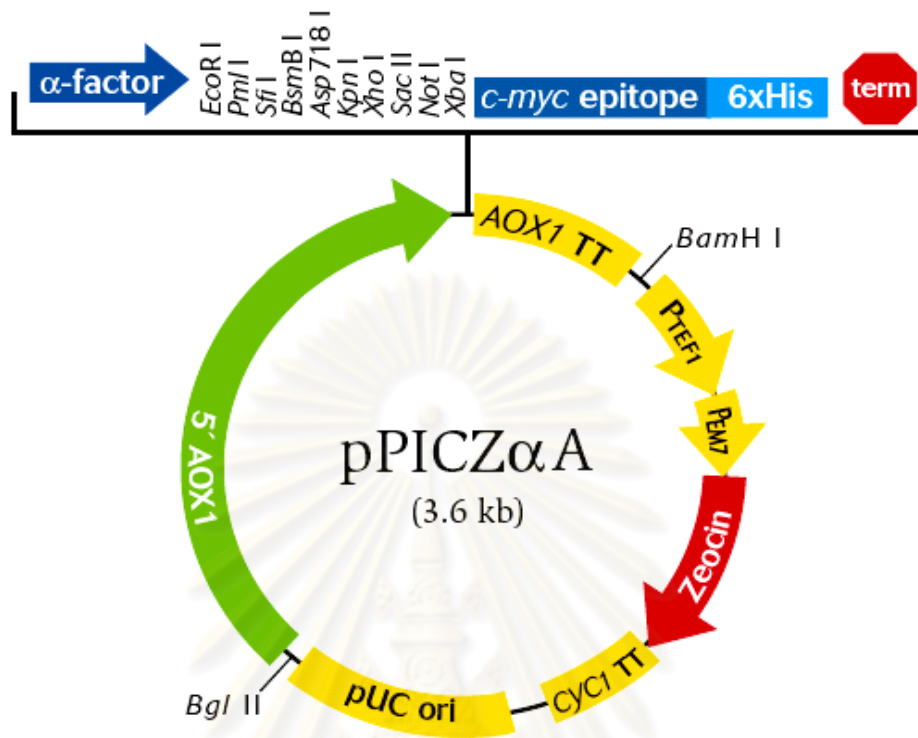
ตารางที่ 3.3 ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ไพรมเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	Tm (°C)
H5-AII 4 Forward	5'-GGGGGAATTCCTCGAGAAAAGAATGGAGAAAATAGTGC-3' <i>Xho</i> I	70.1
H5-AII 4 Reverse	5'-GGGGGCTAGCATGCAAATTCTGCATTG-3' <i>Nhe</i> I	67.6



### 3.3 พลาสมิด

พลาสมิดที่ใช้ในการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 พลาสมิด pPICZ $\alpha$ A (Invitrogen, USA)

5' AOX1 promoter region	1-941
5' AOX1 priming site	855-875
$\alpha$ -factor signal sequence	941-1207
Multiple cloning site	1208-1276
c-myc epitope	1275-1304
Polyhistidine (6XHis) tag	1320-1337
3' AOX1 priming site	1423-1443
AOX1 Transcription termination region	1341-1682
TEF1 promotor	1683-2093
EM71 promotor	2095-2165
<i>Sh ble</i> ORF	2163-2537
CYC1 Transcription termination region	2538-2855
pUC origin	2866-3539

### 3.4 เอนไซม์ตัดจำเพาะ

เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการทดลอง

เอนไซม์ตัดจำเพาะ	บริเวณจดจำ (5'-3')	บัฟเฟอร์	อุณหภูมิในการบ่ม (°C)
<i>Bst</i> X I	CCANNNNN <sup>^</sup> NTGG	O	55
<i>Nhe</i> I	G <sup>^</sup> CTAGC	Tango	37
<i>Xba</i> I	T <sup>^</sup> CTAGA	Tango	37
<i>Xho</i> I	C <sup>^</sup> TCGAG	R	37

O Buffer : 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl และ  
0.1 mg/ml BSA

R Buffer : 10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl และ  
0.1 mg/ml BSA

Tango Buffer : 33 mM Tris-acetate (pH 7.9), 10 mM magnesium acetate,  
66 mM acetate และ 0.1 mg/ml BSA

### 3.5 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

#### 3.5.1 การเก็บรักษาแบคทีเรีย

##### 3.5.1.1 การเก็บรักษาแบคทีเรียในระยะสั้น

เลี้ยง *E. coli* บนอาหารแข็ง LB (ภาคผนวก ก2) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ จนกว่าจะนำมาใช้และถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่ทุก 1 เดือน

##### 3.5.1.2 การเก็บรักษาแบคทีเรียในระยะยาว

เลี้ยง *E. coli* ในอาหารเหลว LB (ภาคผนวก ก1) โดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาผสมกับกลีเซอรอล (ภาคผนวก ข1) ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่อกลีเซอรอล 1:1 โดยปริมาตรรวมเท่ากับ 1 มิลลิลิตร และความเข้มข้นสุดท้ายของกลีเซอรอลเท่ากับ 40% บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็งที่ปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -70 °ซ

### 3.5.2 การเก็บรักษายีสต์

#### 3.5.2.1 การเก็บรักษายีสต์ในระยะสั้น

เลี้ยง *P. pastoris* บนอาหารแข็ง YPD (ภาคผนวก ก5) ป่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะนำมาใช้และถ่ายเชื้อลงอาหารใหม่ทุก 1 เดือน

#### 3.5.2.2 การเก็บรักษายีสต์ในระยะยาว

เลี้ยง *P. pastoris* ในอาหารเหลว YPD (ภาคผนวก ก4) โดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาผสมกับกลีเซอรอล (ภาคผนวก ข1) ในอัตราส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อต่อกลีเซอรอล 1:1 โดยปริมาตรรวมเท่ากับ 1 มิลลิลิตร และความเข้มข้นสุดท้ายของกลีเซอรอลเท่ากับ 40% บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็งที่ปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -70 °C

### 3.6 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

#### 3.6.1 การเพิ่มจำนวนยีนฮีโมแอกกลูตินิน โดยใช้ปฏิกิริยาแลงไธพอลิเมอเรส

นำ cDNA ของยีนฮีโมแอกกลูตินิน (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.นพ.ยง ภู่วรวรรณ ภาควิชาภูมิคุ้มกันศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) ใช้เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยาแลงไธพอลิเมอเรสและใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนฮีโมแอกกลูตินิน โดยผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ดังนี้ cDNA 2 ไมโครลิตร, 0.4 uM H5-All4 Forward and H5-All4 Reverse primers, 1X Thermal Polymerase buffer [20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% (v/v) Triton X-100, pH 8.8], 0.4 mM dNTPs และ 1 unit of *Vent* DNA polymerase (New England Biolabs) เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 25 ไมโครลิตร และทำปฏิกิริยาแลงไธพอลิเมอเรสดังตารางที่ 3.5

#### ตารางที่ 3.5 โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาแลงไธพอลิเมอเรส

Reaction	Temperature (°C)	Time	cycles
Pre-denaturation	94	5 min	-
Denaturation	94	1 min	35
Annealing	55	45 sec	
Extension	72	2 min	
Final extension	72	10 min	-

### 3.6.2 อีเกอโรสเจลอีเล็กโทรโฟรีซิส

เตรียมเจลโดยตั้งผงอีเกอโรส 0.8 กรัม ใส่ลงในขวดสำหรับเตรียมเจล เดิมบัฟเฟอร์ 1X TAE (ภาคผนวก ข5) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ละลายเจลด้วยความร้อน จากนั้นเทลงในถาดสำหรับขึ้นรูปเจลรอจนกระทั่งเจลแข็ง นำเจลที่เตรียมไว้วางบนเครื่องอีเล็กโทรโฟรีซิส และโหลดตัวอย่างดีเอ็นเอลงไป โดยผสมกับ 6X loading buffer (ภาคผนวก ข6) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1X และใช้ GeneRule™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, USA) หรือ Lambda/Hind III (Fermentas, USA) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ทำอีเล็กโทรโฟรีซิสด้วยกระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาทีและนำเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเจลไปแช่ในน้ำกลั่นเพื่อชะเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออก และนำไปถ่ายภาพ

### 3.6.3 การสกัดดีเอ็นเอจากอีเกอโรสเจลโดยใช้ชุด Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit (ภาคผนวก ข7)

นำชิ้นอีเกอโรสที่ต้องการสกัดดีเอ็นเอ (น้ำหนักมากที่สุด 300 มิลลิกรัม) ใส่ลงในหลอดไมโครพิพพ์ เดิมบัฟเฟอร์ DF ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 60 °ซ โดยกลับหลอดไปมาทุก ๆ 1-2 นาที จนกระทั่งเจลละลายหมด จากนั้นเทสารละลายทั้งหมดใส่ใน DF column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เดิมบัฟเฟอร์ W1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ต่อมาเติมบัฟเฟอร์ Wash (เดิมเอทานอลแล้ว) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที 2 ครั้ง ย้ายคอลัมน์ด้านบนใส่ในหลอดไมโครพิพพ์หลอดใหม่ เติมน้ำปลอดประจุหลอดเชื้อลงไป 15-50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ขึ้นดีเอ็นเอที่ต้องการจะอยู่ในสารละลาย

## 3.7 การโคลนยีนฮีโมแอกกลูตินินเข้าในเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก

### 3.7.1 การเชื่อมต่อยีนฮีโมแอกกลูตินินเข้ากับเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก pPICZα

นำยีนฮีโมแอกกลูตินินที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Xho* I และ *Nhe* I มาเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์สำหรับการแสดงออก pPICZα ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Xho* I และ *Xba* I โดยผสมสารละลายต่าง ๆ ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ไมโครลิตรดังนี้ 1X T<sub>4</sub> DNA ligase buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT และ 10 mM ATP], 3 units of T<sub>4</sub> DNA ligase จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 16 °ซ เป็นเวลา 24 ชม

### 3.7.2 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์

ทรานสฟอร์มสารละลายจากข้อ 3.7.1 เข้าสู่คอมพีเทนต์ *E. coli* DH5 $\alpha$  ด้วยวิธี heat shock ดังนี้ นำคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5 $\alpha$  มาแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นใส่สารละลายผสมจากข้อ 3.7.1 ลงในคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* DH5 $\alpha$  ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปั่นน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที จากนั้น heat shock ที่อุณหภูมิ 42 °ซ เป็นเวลา 90 วินาที เมื่อครบเวลาให้แช่ลงในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (ภาคผนวก ก1) ปริมาตร 850 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 °ซ พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่มีสารปฏิชีวนะซีโอสิน 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ก3) จากนั้นนำสารละลายที่เหลือไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาตร 600 ไมโครลิตรทิ้ง ผสมสารละลายที่เหลือในหลอดให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเกลี่ยบนอาหารแข็งชนิดดังกล่าวข้างต้น และนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้น และนำไปตรวจสอบทรานสฟอร์มแมนท์ที่มียีนฮีเอ็มแอกกลูทินินต่อไป

### 3.7.3 การคัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์ที่มียีนฮีเอ็มแอกกลูทินินด้วยวิธี rapid size screening

คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนท์โดยเขี่ยโคโลนีบนอาหารแข็งที่ได้จากข้อ 3.7.2 มาใส่ในสารละลาย pre-warmed lysis buffer [100 mM NaOH, 60 mM KCl, 5 mM EDTA, 10% (w/v) sucrose, 0.25% (w/v) SDS และ 0.05% (w/v) bromphenol blue] ปริมาตร 30 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 5 นาทีแล้วนำไปปั่นในอ่างน้ำแข็งอีก 5 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใสไปตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ตามวิธีในข้อ 3.6.2

### 3.7.4 การสกัดพลาสมิดที่มียีนฮีเอ็มแอกกลูทินินแทรกด้วยชุดสกัดพลาสมิด High-Speed Plasmid Mini kit

นำโคโลนีที่มีส่วนของยีนฮีเอ็มแอกกลูทินินแทรกอยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด มาสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด High-Speed Plasmid Mini kit โดยเลี้ยงรีคอมบิแนนท์โคโลนีในอาหารเหลว LB ที่ผสมซีโอสิน 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อโดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปใส่ในหลอดไมโครพิวจ์และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนน้ำทิ้ง กระจายเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ PD1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PD2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดจนกระทั่งสารละลายผสมเข้ากันจึงเติมบัฟเฟอร์ PD3 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วผสมโดยการกลับหลอดไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่

ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสใส่ลงใน PD column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมน้ำฟอสเฟต W1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วเติมน้ำฟอสเฟต Wash ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้งก่อนที่จะปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง เพื่อกำจัดส่วนใสที่เหลือติดคอลัมน์ จากนั้นย้ายคอลัมน์ใส่ในหลอดไมโครพีพิจ์หลอดใหม่ เติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปริมาตร 15-50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการจะอยู่ในสารละลาย

### 3.7.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้จากข้อ 3.7.4 จะถูกส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Automated DNA sequencer (1<sup>st</sup> Base, Malaysia) และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Vector NTI, Clustal X and GeneDoc programs

## 3.8 การสร้างรีคอมบิแนนท์ยีสต์

### 3.8.1 การเตรียมคอมพิเทนต์เซลล์ของ *P. pastoris*

นำโคโลนีของ *P. pastoris* สายพันธุ์ KM71 ลงในอาหารเหลว (ภาคผนวก ก4) เลี้ยงโดยการเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ จนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.3-1.5 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 x g ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อเย็น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง เติมสารละลาย 1 M sorbital ที่เย็นปริมาตร 5 มิลลิลิตรและปั่นเหวี่ยง 4,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใส และทำซ้ำอีกครั้ง หลังจากนั้นเติมสารละลาย 1 M sorbital ที่เย็นปริมาตร 800 ไมโครลิตรและนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

### 3.8.2 การเตรียมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดให้เป็นเส้นตรง

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เรียบร้อยแล้วมาทำให้เป็นเส้นตรง โดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Bst*X I เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเติม 3 M sodium acetate buffer, pH 5.2 ลงไป 0.1 เท่าของปริมาตรสารละลาย และเติมเอทานอลลงไป 2 เท่าของปริมาตรสารละลายสุดท้าย นำไปปั่นที่อุณหภูมิ -20 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลายมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง และเติม 70% (v/v) เอทานอลที่เย็นจัด ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา

15 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง และตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วนำมาละลายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ทำการตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอตามวิธีในข้อ 3.6.2

### 3.8.3 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพิเทนต์ยีสต์ด้วยวิธี electroporation

นำรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* (ข้อ 3.8.1) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมกับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่เป็นเส้นตรง (ข้อ 3.8.2) ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม ใน 0.2 cm. electro-cuvette บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการผ่านกระแสไฟฟ้าโดยใช้เครื่อง Bio-Rad Gene Pulser ที่สภาวะ 1.5 kV, 25  $\mu$ F and 200  $\Omega$  จากนั้นเติม 1 M sorbital ที่เย็นจัด ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใน cuvette และย้ายเข้าสู่หลอดขนาด 15 มิลลิลิตรทันที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเติมอาหารเหลว YPD แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ ที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลายมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง YPD ที่มีสารปฏิชีวนะซีไอซิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 2-3 วัน สังเกตโคโลนีที่เกิดขึ้น และนำไปตรวจสอบทรานสฟอร์มแมนท์ที่มียีนฮีมแอกกลูทินินต่อไป

### 3.8.4 การสกัดจีโนมดีเอ็นเอของรีคอมบิแนนท์ยีสต์

นำโคโลนีเดี่ยวของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ลงในอาหารเหลว YPD ที่มีสารปฏิชีวนะซีไอซิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ สภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เติมน้ำสกัดละลาย breaking buffer [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 30 mM EDTA (pH 8.0) และ 0.5% (w/v) SDS] ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มเป็นเวลา 15 นาที และเติมน้ำสกัดละลาย 2.5 M potassium acetate, pH 7.5 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนน้ำใสหลอดไมโครพิวเจอร์ใหม่แล้วเติม chloroform : isoamylalcohol (24:1) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำอีกครั้ง หลังจากนั้นเติม isopropanol ลงไป 1 เท่าของปริมาตรสารละลายนำไปตกตะกอนดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 15 นาที ต่อมาเติม 70% (v/v) เมทานอล จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง และตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง หลังจากนั้นเติมน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ

### 3.8.5 การตรวจสอบชั้นยีนฮีโมแอกกลูทินินที่แทรกในจีโนมที่ดีเอ็นเอของยีสต์ โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสประกอบด้วย 1x *Taq* DNA polymerase buffer with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  [75 mM Tris-HCl, 20 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.01% Tween 20], 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.4 mM dNTP, 0.4  $\mu\text{M}$  H5-A114 forward and reverse primers, 5 units *Taq* DNA polymerase และ 3  $\mu\text{M}$  จีโนมที่ดีเอ็นเอของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ สภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาตามตารางที่ 3.5 ทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

### 3.9 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนฮีโมแอกกลูทินิน

#### 3.9.1 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนฮีโมแอกกลูทินิน

นำโคโคไลน์เดี่ยวของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ลงในอาหารเหลว BMGY (ภาคผนวก ก7) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ ที่สภาวะเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งได้ค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 5-6 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งและเติมอาหารเหลว BMMY (ภาคผนวก ก8) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการชักนำให้เกิดการแสดงออกโดยการเติม 3% (v/v) เมทานอล ทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 5 นาที และทำการแยกอาหารเลี้ยงเซลล์ใส่ในหลอดไมโครพีพจใหม่ นำทั้งส่วนของเซลล์ และอาหารเลี้ยงเซลล์มาวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ western blotting

#### 3.9.2 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนฮีโมแอกกลูทินินด้วยวิธี SDS-PAGE

##### 3.9.2.1 การเตรียมตัวอย่างโปรตีนฮีโมแอกกลูทินินในอาหารเลี้ยงเซลล์

นำอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมกับ 5 ไมโครลิตร ของ  $\beta$ -mercaptoethanol และ 10 ไมโครลิตร ของ 4X Sample buffer ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์โดยวิธี SDS PAGE

##### 3.9.2.2 การเตรียมตัวอย่างโปรตีนฮีโมแอกกลูทินินภายในเซลล์

หลังจากทำการปั่นเก็บเซลล์แล้ว นำส่วนของเซลล์มาเติม TEG buffer (ภาคผนวก ข15) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เติม Sample Breaking solution (ภาคผนวก ข16) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ต่อมานำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที



และนำไปป้อนในน้ำแข็งเป็นเวลา 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ส่วนใสถูกแยกใส่หลอดไมโครพิพจี้ใหม่และนำไปวิเคราะห์โดยวิธี SDS-PAGE

### 3.9.2.3 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE

นำตัวอย่างที่เตรียมตามวิธีในข้อ 3.9.2.1 และ 3.9.2.2 มาวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน โดยเตรียมดังตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 การเตรียม SDS-PAGE สำหรับวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน

Solution	5% stacking gel (ml / 10 ml)	10% separating gel (ml / 20 ml)	12.5% separating gel (ml / 20 ml)
H <sub>2</sub> O	6.8	7.9	6.3
30% Acrylamide mix	1.7	6.7	8.3
1 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25	-	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	5.0	5.0
10% SDS	0.1	0.2	0.2
10% APS	0.1	0.2	0.2
TEMED	0.01	0.008	0.008

หลังจากทำการแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แล้วนำไปแช่ใน staining solution (ภาคผนวก ข17) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่า จากนั้นนำไปล้างด้วย destaining solution (ภาคผนวก ข18) จนแผ่นเจลมีลักษณะใส จึงใส่ fixing solution (ภาคผนวก ข19)

### 3.9.2.4 การโอนถ่ายโปรตีนจากเจลไปยัง polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane

หลังจากแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE แล้วตัดส่วนของ stacking gel ที่วัดขนาดเจล และนำเจลไปแช่ใน transfer buffer (ภาคผนวก ข20) และวางบนเครื่องเขย่า ประมาณ 5 นาที ตัดกระดาษกรองจำนวน 6 แผ่น และ PVDF membrane 1 แผ่นให้มีขนาดเท่ากับเจลที่วัด นำแผ่น PVDF membrane แช่ใน absolute methanol ให้ทั่วทั้งแผ่น ล้างด้วยน้ำ

ปิดอดประจุ 1 ครั้ง และแช่ PVDF membrane ใน transfer buffer นำกระดาษกรองแช่ใน transfer buffer จำนวน 3 แผ่น วางบนเครื่อง semi-dry transfer apparatus ตามด้วย PVDF membrane 1 แผ่น, เจล และกระดาษกรองที่แช่ใน transfer buffer อีก 3 แผ่นปิดทับส่วนบน ไล่ฟองอากาศออกโดยใช้หลอดแก้วกลิ้งบนกระดาษกรองเบา ๆ หยด transfer buffer ปริมาณเล็กน้อย ปิดฝาเครื่อง semi-dry western blot เพื่อทำการถ่ายโอนโปรตีนจากเจลไปยัง PVDF membrane โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 70 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 90 นาทีต่อ 1 เจล

### 3.9.2.5 การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนฮิสแท็กกลูทีนินด้วยวิธี western blotting, การตรวจจลัญญาณด้วยวิธี Chemiluminescence และ autoradiography

นำแผ่น PVDF membrane ที่ได้รับการโอนถ่ายโปรตีนเสร็จแล้วมาแช่ใน blocking solution (ภาคผนวก ข21) เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง และนำไปบ่มกับแอนติบอดีต่อ Histidine tag หรือ โปรตีนฮิสแท็กกลูทีนินที่เจือจางใน blocking solution อัตราส่วน 1:1,000 (anti-Histidine tag) หรืออัตราส่วน 1:5,000 (anti-HA) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้าง PVDF membrane ด้วยสารละลาย PBST (ภาคผนวก ข23) เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง และ 15 นาที 2 ครั้ง หลังจากนั้นเติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่จำเพาะต่อ mouse IgG ที่มี HRP เชื่อมอยู่ (anti-mouse IgG HRP) ที่เจือจางใน blocking solution อัตราส่วน 1:2,000 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที หลังจากนั้นล้าง PVDF membrane ด้วยสารละลาย PBST เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง และ 15 นาที 3 ครั้ง นำ PVDF membrane วางลงบนพลาสติกใสพร้อมซับสารละลายที่เกินออก เตรียมส่วนผสมซับสเตรทของ เอนไซม์ horse-radish peroxidase (ภาคผนวก ข24) จากนั้นลาดซับสเตรทและเกลี่ยให้ทั่ว PVDF membrane นาน 1 นาที ซับสารละลายซับสเตรทที่เกินออก และใช้ปากคีบหนีบเมมเบรนวางลงบนพลาสติกใส และปิดทับเมมเบรนด้วยพลาสติกใส ใช้กรรไกรตัดพลาสติกใสโดยรอบเมมเบรนนำไปวางลงบนถาดประกบฟิล์ม ใช้เทปกาวติดมุมทั้ง 4 มุม ปิดฝาถาดและนำไปประกบฟิล์ม X-Ray และล้างฟิล์ม X-Ray ในห้องมืด

## 3.10 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีนฮิสแท็กกลูทีนินในรีคอมบิแนนท์ยีสต์

### 3.10.1 การหาความเข้มข้นของเมทานอลที่เหมาะสม

แสดงออกของโปรตีน ตามวิธีในข้อ 3.9.1 แต่ทำการแปรความเข้มข้นของเมทานอล ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1% (v/v), 2% (v/v), 3% (v/v), 4% (v/v) และ 5% (v/v) บ่มเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์และเซลล์ ทำการสกัดโปรตีนภายในเซลล์ตามวิธีในข้อ 3.9.2.2 และทำการแยกและวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ western blotting

### 3.10.2 การหาจำนวนวันที่เหมาะสม

แสดงออกของโปรตีน ตามวิธีในข้อ 3.9.1 แต่ทำการแปรจำนวนวันที่ใช้ในการบ่ม 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน โดยใช้ 3% (v/v) เมทานอลในการชักนำ จากนั้นทำการเก็บอาหารเลี้ยง เซลล์และเซลล์ ทำการสกัดโปรตีนภายในเซลล์ตามวิธีในข้อ 3.9.2.2 และทำการแยกและวิเคราะห์ โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ western blotting

## 3.11 การทำโปรตีนซีมแอกกลูตินินให้บริสุทธิ์

### 3.11.1 การขยายขนาดในการแสดงออก

เลี้ยงโคโลนีเดี่ยวของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ในอาหารเหลว BMGY ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 2 วัน ในสภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที หลังจากนั้นทำการถ่ายโอนสู่อาหารเหลว BMGY ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเปลี่ยน อาหารเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.10.1 แต่เพิ่มปริมาตรของ BMMY จากเดิม 1 มิลลิลิตร เปลี่ยนเป็น 10 มิลลิลิตร จากนั้นทำการชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย 3%(v/v) เมทานอล เป็นเวลา 2 วัน ทำ การปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนเซลล์มา ผสมกับสารละลาย TEG buffer ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อ นาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งและเติม TEG buffer ใหม่ลงไป ปริมาตร 12 มิลลิลิตร นำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง sonicator เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ ได้นำมารองและนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

### 3.11.2 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำ Ion Exchange chromatography (DEAE Column) มาทำให้อิ่มตัวด้วย บัฟเฟอร์ 20 mM Tris-HCl, pH 8 ปริมาตร 10 column volume (10 CV = 50 มิลลิลิตร) จากนั้น นำโปรตีนจากข้อ 3.13.1 มาใส่ในคอลัมน์โดยเก็บ fraction ละ 3 มิลลิลิตร และใช้ flow rate 1-1.5 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นทำการ eluted โปรตีนโดยใช้ 20 mM Tris-HCl, pH 8 ที่ผสม 300 mM NaCl และ 700 mM NaCl จากนั้นทำการคัดเลือก fraction ด้วย SDS-PAGE, western blotting และ การทดสอบปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดง เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งโดยใช้ Gel Filtration chromatography จากนั้นทำการรวม fraction และใส่ 7 M urea และทำการทำให้ บริสุทธิ์อีกครั้ง โดยใช้ Gel Filtration chromatography (Sephacryl S-200 Column) ที่อิ่มตัวด้วย 20 mM Tris-HCl, pH 8 ที่ผสม 7 M urea ปริมาตร 10 column volume ( 10 CV = 1,200 มิลลิลิตร) โดยเก็บ fraction ละ 2 มิลลิลิตร และใช้ flow rate 0.5-0.8 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นนำ โปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนต่อไป

### 3.12 การศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนฮีมาแอกกลูตินิน

#### 3.12.1 การทดสอบปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดง (Hemagglutination test)

นำเม็ดเลือดแดง ปริมาตร 50 ไมโครลิตรมาล้างด้วย 1X PBS และทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาผสมกับ 1X PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาเจือจางด้วย 1X PBS อัตราส่วน 1:10, 1:100 และ 1:1,000 ต่อมานำโปรตีนที่ผ่านการเจือจางปริมาตร 50 ไมโครลิตร, เม็ดเลือดแดง ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ 1X PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาผสมใน 96-well plate บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที โดยเปรียบเทียบกับไวรัส

#### 3.12.2 การทดสอบการตัดโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินด้วยเอนไซม์ Furin

นำโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยให้มีความเข้มข้นเท่ากันมาทำการทดสอบการตัดด้วยเอนไซม์ Furin ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (2 units) จากนั้นเติม 4X Furin buffer [400 mM HEPES pH 7.5, 2% Triton X-100, 4 mM CaCl<sub>2</sub> และ 4 mM 2-mercaptoethanol] และน้ำปลอดประจุปราศจากเชื้อให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 40 ไมโครลิตร ต่อมานำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 6 ชั่วโมงและนำมาแยกโปรตีนและวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE และ western blotting

## บทที่ 4

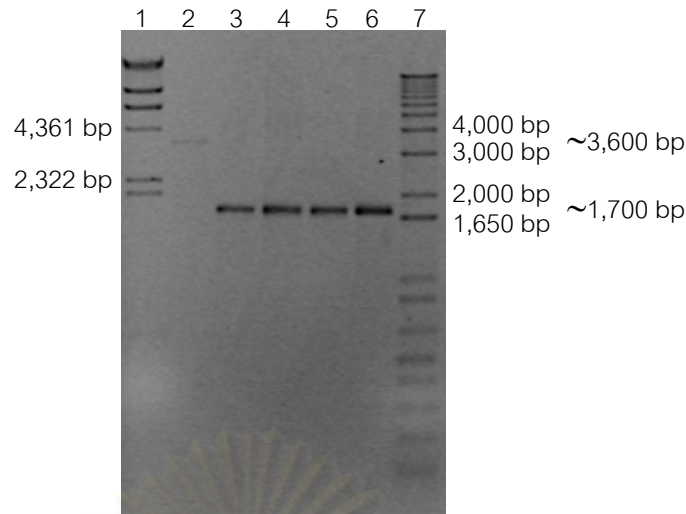
### ผลการทดลอง

#### 4.1 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

จากการนำ cDNA ของยีนฮีโมแอกกลูตินินจากเชื้อไวรัสไข้หวัดนกที่มีความแตกต่างกันของสายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูง 2 สายพันธุ์ คือ ฮีโมแอกกลูตินินสายพันธุ์ A/chicken/Thailand/168/2006 (H5N1) (168-2006) และฮีโมแอกกลูตินินสายพันธุ์ A/chicken/Thailand/ NP-172/2006 (172-2006) และสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคต่ำ 1 สายพันธุ์ ซึ่งดัดแปลงมาจาก A/chicken/Thailand/168/2006 (H5N1) (168-2006) มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันตามวิธีในข้อ 3.7.1 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันดังกล่าวมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I และ *Nhe* I และทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าได้ขนาดประมาณ 1,700 คู่เบส (รูปที่ 4.1 และ 4.2) จากนั้นสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสโดยใช้ชุด Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit (Geneaid, Taiwan) และ นำสารละลายผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วไปโคลนเข้าเวกเตอร์ pPICZα เพื่อใช้สำหรับการแสดงออก

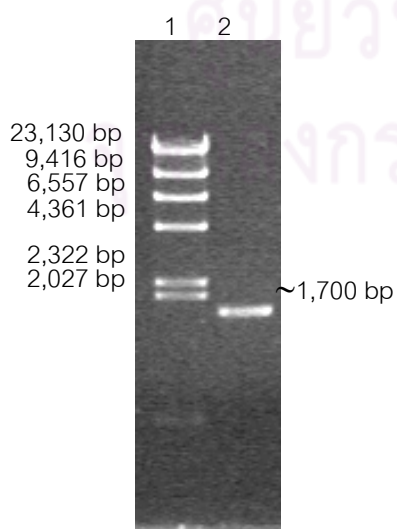
สำหรับเวกเตอร์ที่ใช้สำหรับการแสดงออก pPICZα จะทำการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าไปในแบคทีเรียเพื่อเพิ่มปริมาณใน *E. coli* สายพันธุ์ DH5α จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดจากแบคทีเรียด้วยชุดสกัดพลาสมิด High-Speed Plasmid Mini kit ต่อมานำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I และ *Xba* I และตรวจสอบพลาสมิดที่ได้โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าได้ขนาดประมาณ 3,600 คู่เบส (รูปที่ 4.1 เลนที่ 1)

จากนั้นทำการเชื่อมพลาสมิดเข้ากับชิ้นดีเอ็นเอฮีโมแอกกลูตินินเข้าด้วยกัน โดยเอนไซม์ T4 DNA Ligase และทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยวิธี heat shock คัดเลือกทรานสฟอร์มแมนที่ต้าน zeocin มาสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด และทำการยืนยันการโคลนนิ่งโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.1 pPICZ $\alpha$ A และ ยีนฮีมแอกกลูทีนินสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูง 4 สายพันธุ์

- |          |  |
|----------|--|
| เลนที่ 1 | Lambda/ <i>Hin</i> dIII  |
| เลนที่ 2 | pPICZ $\alpha$ A ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ <i>Xba</i> I และ <i>Xho</i> I  |
| เลนที่ 3 | ยีนฮีมแอกกลูทีนิน สายพันธุ์ A/white/peafowl/Bangkok/Thailand /CU-16/04 (16-2004) ที่ถูกตัดด้วย <i>Nhe</i> I และ <i>Xho</i> I |
| เลนที่ 4 | ยีนฮีมแอกกลูทีนิน สายพันธุ์ A/chicken/Thailand/Nontaburi/CK 162/05 (162-2005) ที่ถูกตัดด้วย <i>Nhe</i> I และ <i>Xho</i> I    |
| เลนที่ 5 | ยีนฮีมแอกกลูทีนิน สายพันธุ์ A/chicken/Thailand/168/2006(H5N1) (168-2006) ที่ถูกตัดด้วย <i>Nhe</i> I และ <i>Xho</i> I         |
| เลนที่ 6 | ยีนฮีมแอกกลูทีนิน สายพันธุ์ A/chicken/Thailand/NP-172/06 (172-2006) ที่ถูกตัดด้วย <i>Nhe</i> I และ <i>Xho</i> I              |
| เลนที่ 7 | 1 kb plus ladder (Invitrogen, U.S.A.)  |



รูปที่ 4.2 ผลการตัดชิ้นยีนฮีมแอกกลูทีนิน สายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคต่ำ (LPAI) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เลนที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda/*Hind* III

เลนที่ 2 ยีนฮีมแอกกลูทีนิน สายพันธุ์ LPAI ที่ถูกตัดด้วย *Nhe* I และ *Xho* I

	*            20            *            40            *            60            *		80
172_8_fuse :	ATGAGATTTCCCTTCaATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGA		80
168_18_fus :	ATGAGATTTCCCTTCaATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGA		80
LPAI_c115 :	ATGAGATTTCCCTTCaATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGA		80
	*            100            *            120            *            140            *		160
172_8_fuse :	AGATGAAACGGCACAAATTCGGGCTGAAGCTGTATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGC		160
168_18_fus :	AGATGAAACGGCACAAATTCGGGCTGAAGCTGTATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGC		160
LPAI_c115 :	AGATGAAACGGCACAAATTCGGGCTGAAGCTGTATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGC		160
	*            180            *            200            *            220            *		240
172_8_fuse :	CATTITTCACACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTA		240
168_18_fus :	CATTITTCACACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTA		240
LPAI_c115 :	CATTITTCACACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTA		240
	*            260            *            280            *            300            *		320
172_8_fuse :	TCTCTCGAGAAAAGAAATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTGGCAATAGTCAGCTTGTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGG		320
168_18_fus :	TCTCTCGAGAAAAGAAATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTGGCAATAGTCAGCTTGTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGG		320
LPAI_c115 :	TCTCTCGAGAAAAGAAATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTGGCAATAGTCAGCTTGTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGG		320
	*            340            *            360            *            380            *		400
172_8_fuse :	TTACCATGCAAAACAACCTCGACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATAC		400
168_18_fus :	TTACCATGCAAAACAACCTCGACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATAC		400
LPAI_c115 :	TTACCATGCAAAACAACCTCGACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACATAC		400
	*            420            *            440            *            460            *		480
172_8_fuse :	TGGAAAAGACACACAACCGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTGAAGATTTGTAGTGTAGCTGGA		480
168_18_fus :	TGGAAAAGACACACAACCGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTGAAGATTTGTAGTGTAGCTGGA		480
LPAI_c115 :	TGGAAAAGACACACAACCGGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTTGAAGATTTGTAGTGTAGCTGGA		480
	*            500            *            520            *            540            *		560
172_8_fuse :	TGGCTCCTCGGAAACCAATGTGTGACGAAATTCATCAATGTGCCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAGC		560
168_18_fus :	TGGCTCCTCGGAAACCAATGTGTGACGAAATTCATCAATGTGCCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAGC		560
LPAI_c115 :	TGGCTCCTCGGAAACCAATGTGTGACGAAATTCATCAATGTGCCGGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAGC		560
	*            580            *            600            *            620            *		640
172_8_fuse :	CAATGACCTCTGTTACCAGGGAAATTTCAATGACTATGAAGAATGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTTGGAGA		640
168_18_fus :	CAATGACCTCTGTTACCAGGGAAATTTCAATGACTATGAAGAATGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTTGGAGA		640
LPAI_c115 :	CAATGACCTCTGTTACCAGGGAAATTTCAATGACTATGAAGAATGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCATTTTGGAGA		640
	*            660            *            680            *            700            *		720
172_8_fuse :	AAATTCAGATCATCCCAAAAAGTTCTTGGTCCAGTCAATGAAGCCTCATCAGGGGTGAGCTCAGCATGTCCATACCGGGA		720
168_18_fus :	AAATTCAGATCATCCCAAAAAGTTCTTGGTCCAGTCAATGAAGCCTCATCAGGGGTGAGCTCAGCATGTCCATACCGGGA		720
LPAI_c115 :	AAATTCAGATCATCCCAAAAAGTTCTTGGTCCAGTCAATGAAGCCTCATCAGGGGTGAGCTCAGCATGTCCATACCGGGA		720
	*            740            *            760            *            780            *		800
172_8_fuse :	AAGTCTCCTTTTTTCAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAATACATACCCAACAATAAAGAGAGCTACAATAA		800
168_18_fus :	AAGTCTCCTTTTTTCAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAATACATACCCAACAATAAAGAGAGCTACAATAA		800
LPAI_c115 :	AAGTCTCCTTTTTTCAGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAACAATACATACCCAACAATAAAGAGAGCTACAATAA		800
	*            820            *            840            *            860            *		880
172_8_fuse :	TACCAACCAAGGAAGATCTTTTGTACTGTGGGGATTCCATCTTCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAAGCTCTATCAAA		880
168_18_fus :	TACCAACCAAGGAAGATCTTTTGTACTGTGGGGATTCCATCTTCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAAGCTCTATCAAA		880
LPAI_c115 :	TACCAACCAAGGAAGATCTTTTGTACTGTGGGGATTCCATCTTCTAATGATGCGGCAGAGCAGACAAAGCTCTATCAAA		880
	*            900            *            920            *            940            *		960
172_8_fuse :	ACCCAACCACCTATATTTCTGTTGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAATAGCTACTAGTCCAAAGGTA		960
168_18_fus :	ACCCAACCACCTATATTTCTGTTGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAATAGCTACTAGTCCAAAGGTA		960
LPAI_c115 :	ACCCAACCACCTATATTTCTGTTGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAAATAGCTACTAGTCCAAAGGTA		960
	*            980            *            1000            *            1020            *		1040
172_8_fuse :	AACGGGCAAAGTGAAGGATGGATCTCTCTGGACAATGTTAAAACCGAATGATGCAATCACTTCGAGAGTAATGGAAA		1040
168_18_fus :	AACGGGCAAAGTGAAGGATGGATCTCTCTGGACAATGTTAAAACCGAATGATGCAATCACTTCGAGAGTAATGGAAA		1040
LPAI_c115 :	AACGGGCAAAGTGAAGGATGGATCTCTCTGGACAATGTTAAAACCGAATGATGCAATCACTTCGAGAGTAATGGAAA		1040
	*            1060            *            1080            *            1100            *		1120
172_8_fuse :	TTTCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAGCAGTTATGAAAAGTGAATGGAAATGGTA		1120
168_18_fus :	TTTCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAGCAGTTATGAAAAGTGAATGGAAATGGTA		1120
LPAI_c115 :	TTTCATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGGACTCAGCAGTTATGAAAAGTGAATGGAAATGGTA		1120
	*            1140            *            1160            *            1180            *		1200
172_8_fuse :	ACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCAAATAGGGGCGATAAATCTAGTATGCCATCCACAATATACACCCCTCTCAGCATC		1200
168_18_fus :	ACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCAAATAGGGGCGATAAATCTAGTATGCCATCCACAATATACACCCCTCTCAGCATC		1200
LPAI_c115 :	ACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCAAATAGGGGCGATAAATCTAGTATGCCATCCACAATATACACCCCTCTCAGCATC		1200

รูปที่ 4.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนฮิมแมกกลูทินินที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pPIC20A

```

*      1220      *      1240      *      1260      *      1280
172_8_fuse : GGGGAATGCCCAAATATGTGAAATCAAACAATTAGTCCTTGGCACTGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAGAGAGAAGAAG 1280
168_18_fus : GGGGAATGCCCAAATATGTGAAATCAAACAATTAGTCCTTGGCACTGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAGAGAGAAGAAG 1280
LPAI_c115 : GGGGAATGCCCAAATATGTGAAATCAAACAATTAGTCCTTGGCACTGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAGAGAGAAGAAG 1280
GGGGAATGCCCAAATATGTGAAATCAAACAATTAGTCCTTGGCACTGGGCTCAGAAATAGCCCTCAAGAGAGAAGAAG

*      1300      *      1320      *      1340      *      1360
172_8_fuse : AAGAAAA---AGAGGACTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATG 1357
168_18_fus : AAGAAAAAAGAGAGGATTTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATG 1360
LPAI_c115 : A-----GGAATTTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATG 1348
Aagaaaa  agaGGATTTATTTGGAGCTATAGCAGGTTTTATAGAGGGGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATG

*      1380      *      1400      *      1420      *      1440
172_8_fuse : GGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAAGGCAATAGATGGAGTCACC 1437
168_18_fus : GGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAAGGCAATAGATGGAGTCACC 1440
LPAI_c115 : GGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAAGGCAATAGATGGAGTCACC 1428
GGTACCACCATAGCAATGAGCAGGGGAGTGGGTACGCTGCAGACAAAGAATCCACTCAAAAGGCAATAGATGGAGTCACC

*      1460      *      1480      *      1500      *      1520
172_8_fuse : AATAAGGTCAACTCGATTCATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAACTTAGAAAGGAG 1517
168_18_fus : AATAAGGTCAACTCGATTAATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAACTTAGAAAGGAG 1520
LPAI_c115 : AATAAGGTCAACTCGATTAATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAACTTAGAAAGGAG 1508
AATAAGGTCAACTCGATTAATTGACAAAATGAACACTCAGTTTGAGGCCGTTGGAAGGGAATTTAACTTAGAAAGGAG

*      1540      *      1560      *      1580      *      1600
172_8_fuse : AATAGAGAAATTTAAACAAGAAATGGAAGACGGATTCCTAGATGTCTGGACTTAAATGCTGAACCTCTGGTTCTCATGG 1597
168_18_fus : AATAGAGAAATTTAAACAAGAAATGGAAGACGGATTCCTAGATGTCTGGACTTAAATGCTGAACCTCTGGTTCTCATGG 1600
LPAI_c115 : AATAGAGAAATTTAAACAAGAAATGGAAGACGGATTCCTAGATGTCTGGACTTAAATGCTGAACCTCTGGTTCTCATGG 1588
AATAGAGAAATTTAAACAAGAAATGGAAGACGGATTCCTAGATGTCTGGACTTAAATGCTGAACCTCTGGTTCTCATGG

*      1620      *      1640      *      1660      *      1680
172_8_fuse : AAAATGAGAGAACCTAGACTTTCATGACTCAAATGTCAAGAACCCTTACGACAAGGTCGGACTACAGCTTAGGGATAAT 1677
168_18_fus : AAAATGAGAGAACCCTAGACTTTCATGACTCAAATGTCAAGAACCCTTACGACAAGGTCGGACTACAGCTTAGGGATAAT 1680
LPAI_c115 : AAAATGAGAGAACCCTAGACTTTCATGACTCAAATGTCAAGAACCCTTACGACAAGGTCGGACTACAGCTTAGGGATAAT 1668
AAAATGAGAGAACCCTAGACTTTCATGACTCAAATGTCAAGAACCCTTACGACAAGGTCGGACTACAGCTTAGGGATAAT

*      1700      *      1720      *      1740      *      1760
172_8_fuse : GCAAAGGAGCTGGGTAAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCAAGAAATGTGATAATGAATGATGGAAAGTGTGAGAAACGGAAAC 1757
168_18_fus : GCAAAGGAGCTGGGTAAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCAAGAAATGTGATAATGAATGATGGAAAGTGTGAGAAACGGAAAC 1760
LPAI_c115 : GCAAAGGAGCTGGGTAAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCAAGAAATGTGATAATGAATGATGGAAAGTGTGAGAAACGGAAAC 1748
GCAAAGGAGCTGGGTAAACGGTTGTTTCGAGTTCTATCAAGAAATGTGATAATGAATGATGGAAAGTGTGAGAAACGGAAAC

*      1780      *      1800      *      1820      *      1840
172_8_fuse : GTATGACTACCCCGAGTATTCAGAAGAAGCAAAAGTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAAAAATGGAATCAATAGGAA 1837
168_18_fus : GTATGACTACCCCGAGTATTCAGAAGAAGCAAAAGTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAAAAATGGAATCAATAGGAA 1840
LPAI_c115 : GTATGACTACCCCGAGTATTCAGAAGAAGCAAAAGTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAAAAATGGAATCAATAGGAA 1828
GTATGACTACCCCGAGTATTCAGAAGAAGCAAAAGTAAAAAGAGAGGAAATAAGTGGAGTAAAAATGGAATCAATAGGAA

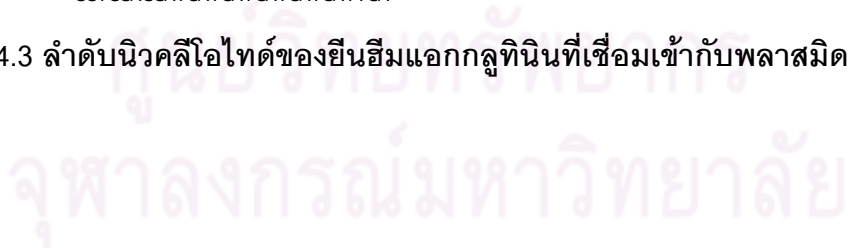
*      1860      *      1880      *      1900      *      1920
172_8_fuse : CTTACCAAATACTGTCAATTTATTCACAGCTGGCAGTTCTAGCACTGGCAATCATGGTGGCTGGTCTATCCTTATGG 1917
168_18_fus : TTTACCAAATACTGTCAATTTATTCACAGTGGCAGTTCTAGCACTGGCAATCATGGTAGCTGGTCTATCCTTATGG 1920
LPAI_c115 : TTTACCAAATACTGTCAATTTATTCACAGTGGCAGTTCTAGCACTGGCAATCATGGTAGCTGGTCTATCCTTATGG 1908
TTTACCAAATACTGTCAATTTATTCACAGTGGCAGTTCTAGCACTGGCAATCATGGTAGCTGGTCTATCCTTATGG

*      1940      *      1960      *      1980      *      2000
172_8_fuse : ATGTGCTCCAATGGGTCGTTACAATGCAGAATTTGCATGCTAGAACAATAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCCG 1997
168_18_fus : ATGTGCTCCAATGGGTCGTTACAATGCAGAATTTGCATGCTAGAACAATAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCCG 2000
LPAI_c115 : ATGTGCTCCAATGGGTCGTTACAATGCAGAATTTGCATGCTAGAACAATAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCCG 1988
ATGTGCTCCAATGGGTCGTTACAATGCAGAATTTGCATGCTAGAACAATAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCCG

*      2020
172_8_fuse : CGTCGACCATCATCATCATCATCATTGA 2025
168_18_fus : CGTCGACCATCATCATCATCATCATTGA 2028
LPAI_c115 : CGTCGACCATCATCATCATCATCATTGA 2016
CGTCGACCATCATCATCATCATCATTGA

```

รูปที่ 4.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนฮีมแอกกลูทินินที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pPICZαA

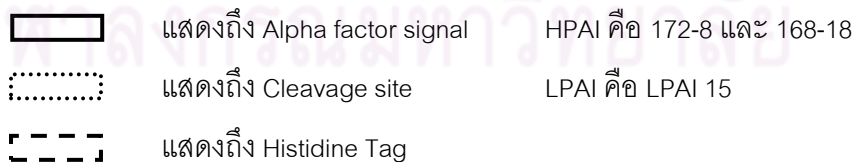




จากนั้นแปรรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนฮีมแอกกลูทินินที่เชื่อมกับ pPICZα เป็นลำดับกรดอะมิโน (รูปที่ 4.4) พบว่ามีการแปรรหัสถูกต้อง ซึ่งมีส่วนของ α-signal factor ที่ทำให้คาดว่า โปรตีนสามารถหลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ และมีบริเวณของโปรตีนฮีสติดีน 6 ตัวทางด้านปลายของลำดับกรดอะมิโน

172_8_fuse	MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTNNGLLFINTTIIASIAAKEEGV	80
168_18_fus	MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTNNGLLFINTTIIASIAAKEEGV	80
LPAI_c115	MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNSTNNGLLFINTTIIASIAAKEEGV	80
172_8_fuse	SLEKRMEKIVLLFAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGKLCDLGDKVPLILRDCSVA	160
168_18_fus	SLEKRMEKIVLLFAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMERNVTVTHAQDILEKTHNGKLCDLGDKVPLILRDCSVA	160
LPAI_c115	SLEKRMEKIVLLFAIVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIME4NVTVTHAQDILEKTHNGKLCDLGDKVPLILRDCSVA	160
172_8_fuse	WLLGNPMCDEFINPEWSYIVVEKANPNDLCPYGNFNDYEEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSHSEASIGVSSACPYIG	240
168_18_fus	WLLGNPMCDEFINPEWSYIVVEKANPNDPYPGDFNDYEEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSHSEASIGVSSACPYIG	240
LPAI_c115	WLLGNPMCDEFINPEWSYIVVEKANPNDPYPGDFNDYEEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSHSEASIGVSSACPYIG	240
172_8_fuse	TPSFFRNVVWLIKKNSTYPTIKRSYNNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPKIATRSKV	320
168_18_fus	KSSFFRNVVWLIKKNSTYPTIKRSYNNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPRIATRSKV	320
LPAI_c115	KSSFFRNVVWLIKKNSTYPTIKRSYNNNTNQEDLLVLWGIHHPNDAAEQTKLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVP4IATRSKV	320
172_8_fuse	NGQSGRMDFWTLKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKGDSAVMKSEVEYGNCNTKCQTP6GAINSSMPFHNIHPLTI	400
168_18_fus	NGQSGRMDFWTLKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKGDSITMKSELEYGNCNTKCQTP6GAINSSMPFHNIHPLTI	400
LPAI_c115	NGQSGRMDFWTLKPNDAINFESNGNFIAPYAYKIVKKGDSITMKSELEYGNCNTKCQTP6GAINSSMPFHNIHPLTI	400
172_8_fuse	GECPKYVKS4LVLATGLRNSPQRERRRk rGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGSYAADKESTQKAIDGVT	479
168_18_fus	GECPKYVKS4LVLATGLRNSPQRERRRk rGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGSYAADKESTQKAIDGVT	480
LPAI_c115	GECPKYVKS4LVLATGLRNSPQRERRRk rGLFGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQSGSYAADKESTQKAIDGVT	476
172_8_fuse	NKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNLERRIENLNKMKMEDGFLDVWVTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNPYDKVRLQLRDN	559
168_18_fus	NKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNLERRIENLNKMKMEDGFLDVWVTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNPYDKVRLQLRDN	560
LPAI_c115	NKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNLERRIENLNKMKMEDGFLDVWVTYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNPYDKVRLQLRDN	556
172_8_fuse	AKELGNGCFEFYHCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLKRREISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLW	639
168_18_fus	AKELGNGCFEFYHCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEARLKRREISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLW	640
LPAI_c115	AKELGNGCFEFYHCDNECMESVRNGTYDYPQYSEEA4LKRREISGVKLESIGTYQILSIYSTVASSLALAIMVAGLSLW	636
172_8_fuse	MCSNGSLQCRICMLEQKLISEDLNSAVDHHHHHHH	674
168_18_fus	MCSNGPLQCRICMLEQKLISEDLNSAVDHHHHHHH	675
LPAI_c115	MCSNGPLQCRICMLEQKLISEDLNSAVDHHHHHHH	671

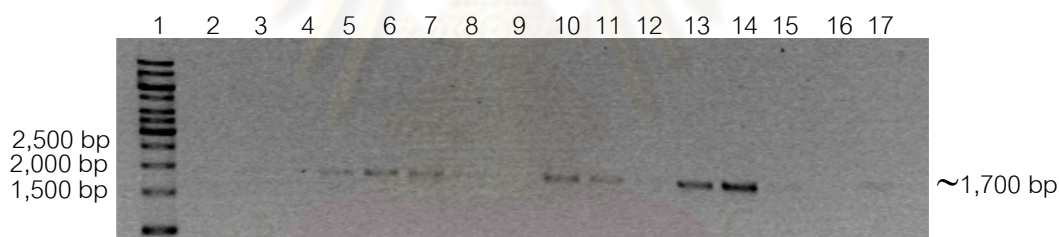
รูปที่ 4.4 ลำดับของกรดอะมิโนของยีนฮีมแอกกลูทินินที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pPICZα



จากข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน จึงทำการเลือกโคลนของโปรตีนฮีมแอกกลูทินินสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูง คือ 168-2006 โคลน 18 และ 172-2006 โคลน 8 ส่วนโปรตีนฮีมแอกกลูทินินที่มีความรุนแรงในการก่อโรคต่ำ คือ LPAI โคลน 15 เพื่อทำการสร้างรีคอมบิแนนท์ยีสต์และใช้ในการแสดงออกของโปรตีนฮีมแอกกลูทินินต่อไป

## 4.2 การสร้างรีคอมบิแนนท์ยีสต์

หลังจากทำการเลือกโคลน 168-2006 โคลน 18, 172-2006 โคลน 8 และ LPAI โคลน 15 ซึ่งเป็นโคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนถูกต้องแล้ว ทำการสกัดพลาสมิดและทำให้เป็นเส้นตรงโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*X I จากนั้นนำเข้าสู่ *P. pastoris* สายพันธุ์ KM 71 ด้วยวิธี electroporation เพื่อให้เกิดการแทรกเข้าสู่จีโนมของยีสต์ ทรานสฟอร์แมนที่ได้จะถูกคัดเลือกบนอาหารแข็ง YPD ที่ผสม zeocin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำทรานสฟอร์แมนมาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ และทำการตรวจสอบยีนฮีมแอกกลูตินินที่แทรกเข้าสู่จีโนมของยีสต์ด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนฮีมแอกกลูตินิน (H5-All4 Forward และ Reverse primers) จากผลการทดลอง พบจีโนมิกดีเอ็นเอของทรานสฟอร์แมนยีสต์ที่มีชิ้นส่วนของยีนฮีมแอกกลูตินินสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคสูงแทรกอยู่ โดยโคลน 168-2006 โคลน 18 พบจำนวน 11 โคลน (รูปที่ 4.5) ส่วน 172-2006 โคลน 8 พบจำนวน 5 โคลน (รูปที่ 4.6) และ ส่วนของยีนฮีมแอกกลูตินินสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคต่ำแทรกอยู่ในจีโนมของยีสต์ LPAI โคลน 15 พบจำนวน 8 โคลน (รูปที่ 4.7)

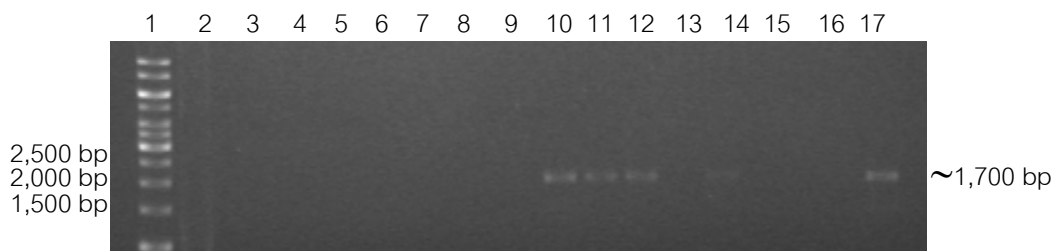


รูปที่ 4.5 ชิ้นส่วนของยีนฮีมแอกกลูตินินสายพันธุ์ 168-2006 โคลน 18 ที่แทรกอยู่ในจีโนมิกดีเอ็นเอของ *P. pastoris*

เลนที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb Ladder

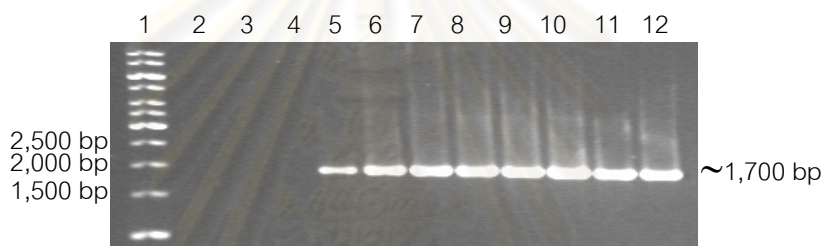
เลนที่ 2 รีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มี pPICZαA

เลนที่ 5-17 รีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* โคลน 1-13 ตามลำดับ



รูปที่ 4.6 ชิ้นส่วนของยีนฮีโมแอกกลูตินินสายพันธุ์ 172-2006 โคลน 8 ที่แทรกอยู่ในจีโนมมิกติเอ็นเอของ *P. pastoris*

- เลนที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb Ladder  
 เลนที่ 2 รีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มี pPICZαA  
 เลนที่ 10-17 รีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* โคลน 38-45 ตามลำดับ

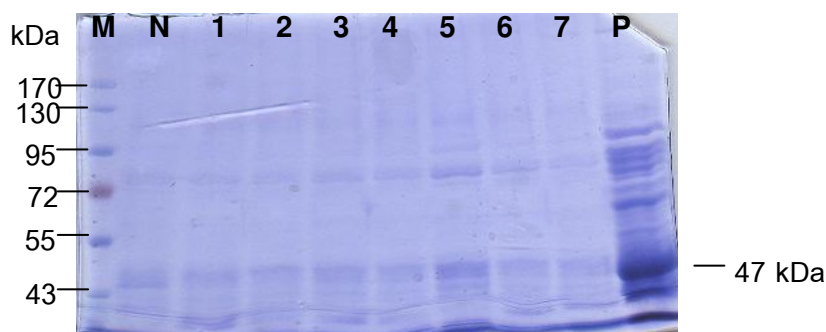


รูปที่ 4.7 ชิ้นส่วนของยีนฮีโมแอกกลูตินินสายพันธุ์ LPAI โคลน15 ที่แทรกอยู่ในจีโนมมิกติเอ็นเอของ *P. pastoris*

- เลนที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb Ladder  
 เลนที่ 2 รีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มี pPICZαA  
 เลนที่ 5-12 รีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* โคลน 1-8 ตามลำดับ

#### 4.3 การคัดเลือกรีคอมบิแนนท์ยีสต์ในการแสดงออกของโปรตีนฮีโมแอกกลูตินิน

เลือกรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่มีส่วนของยีนฮีโมแอกกลูตินินแทรกอยู่ภายในจีโนมของยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ มาชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนฮีโมแอกกลูตินิน โดยใช้ 3% (v/v) เมทานอลเป็นตัวชักนำเป็นเวลาทั้งหมด 7 วัน โดยมีรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่มียีนนิวรามินิเดส (วิทยานิพนธ์ของน.ส. ชนิษฐา นิวาสะบุตร) ที่ผ่านการชักนำเป็นตัวควบคุม หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์การแสดงออกโดยใช้ SDS-PAGE จากผลการทดลองเมื่อนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ไม่พบแถบโปรตีนของฮีโมแอกกลูตินิน ซึ่งมีขนาดประมาณ 62 กิโลดาลตัน แต่พบการแสดงออกของโปรตีนนิวรามินิเดสที่มีขนาดประมาณ 47 กิโลดาลตัน ดังรูปที่ 4.8-4.10



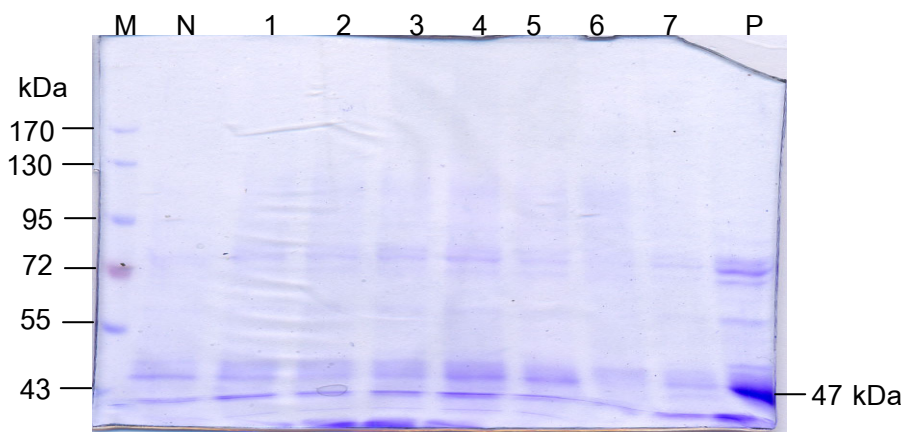
รูปที่ 4.8 อาหารเลี้ยงเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินินสายพันธุ์ 168-2006

- เลนที่ M Protein Marker (Fermentas, U.S.A)
- เลนที่ N อาหารเลี้ยงเซลล์รีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มี pPICZCUA (negative control)
- เลนที่ 1-7 อาหารเลี้ยงเซลล์รีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 1-4, 6-7 และ 9 ตามลำดับ
- เลนที่ P อาหารเลี้ยงเซลล์รีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินินสายพันธุ์ 162-2005 (positive control) (47 กิโลดาลตัน)



รูปที่ 4.9 อาหารเลี้ยงเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 172-2006

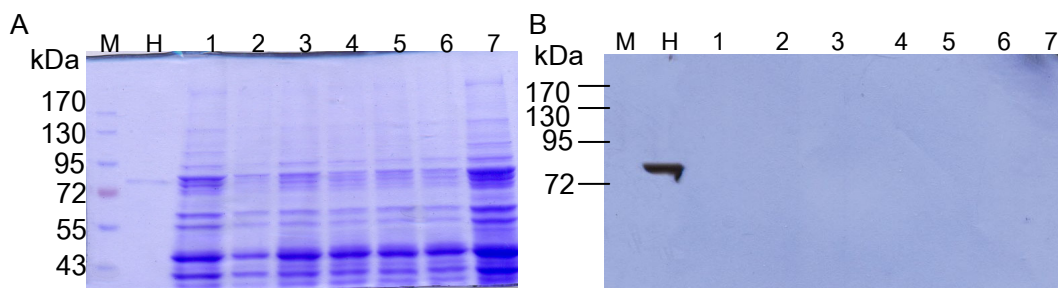
- เลนที่ M Protein Marker (Fermentas, U.S.A)
- เลนที่ N อาหารเลี้ยงเซลล์รีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มี pPICZCUA (negative control)
- เลนที่ 1-5 อาหารเลี้ยงเซลล์รีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38-40, 42 และ 45 ตามลำดับ
- เลนที่ P อาหารเลี้ยงเซลล์รีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินินสายพันธุ์ 162-2005 (positive control) (47 กิโลดาลตัน)



รูปที่ 4.10 อาหารเลี้ยงเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ LPAI-15

- เลนที่ M Protein Marker (Fermentas, U.S.A)  
 เลนที่ N อาหารเลี้ยงเซลล์รีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มี pPICZCUA (negative control)  
 เลนที่ 1-5 อาหารเลี้ยงเซลล์รีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ LPAI-15  
 ไคลนที่ 1-7 ตามลำดับ  
 เลนที่ P อาหารเลี้ยงเซลล์รีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนนิวรามินิเดส สายพันธุ์ 162-2005  
 (positive control) (47 กิโลดาลตัน)

จากผลการทดลอง ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนฮีโมแอกกลูตินินในอาหารเลี้ยงเซลล์ มีความเป็นไปได้ 2 กรณี กรณีที่หนึ่ง คือ รีคอมบิแนนท์ยีสต์ไม่แสดงออกของโปรตีนฮีโมแอกกลูตินิน กรณีที่สอง คือ รีคอมบิแนนท์ยีสต์มีการแสดงออกของโปรตีนฮีโมแอกกลูตินินแต่เก็บไว้ในเซลล์ เพื่อพิสูจน์จึงได้ทำการสกัดโปรตีนรวมของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่อยู่ภายในเซลล์ หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และทำการยืนยันผลโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับ Histidine tag ซึ่งไม่พบสัญญาณแถบของโปรตีนฮีโมแอกกลูตินินประมาณ 62 กิโลดาลตัน เกิดขึ้นในทุกสายพันธุ์ เมื่อทำการทดสอบโดยใช้ western blotting เปรียบเทียบกับตัวควบคุมที่มีส่วนของ Histidine tag พบว่าไม่พบสัญญาณแถบของโปรตีนฮีโมแอกกลูตินินประมาณ 62 กิโลดาลตัน แต่พบสัญญาณแถบโปรตีนของตัวควบคุมที่มีส่วนของ Histidine tag ดังรูปที่ 4.11-4.12 (A และ B)



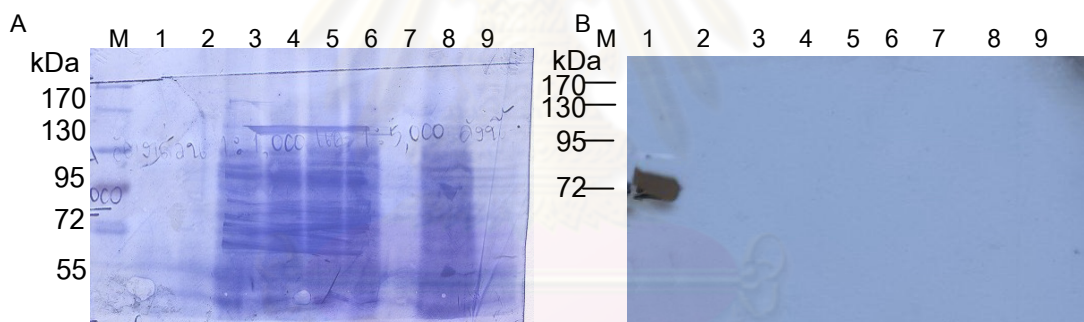
รูปที่ 4.11 SDS-PAGE (A) และ western blotting (B) ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮิสแท็กกลูทีนิน สายพันธุ์ 168-2006 และ สายพันธุ์ 172-2006 โดยใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ Histidine Tag

เลนที่ M Protein Marker (Fermentas, U.S.A)

เลนที่ H Rice Protein with Histidine Tag (73 กิโลดาลตัน)

เลนที่ 1-5 โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮิสแท็กกลูทีนิน สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 1-4 และ 6

เลนที่ 6-7 โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮิสแท็กกลูทีนิน สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 42 และ 45



รูปที่ 4.12 SDS-PAGE (A) และ western blotting (B) ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮิสแท็กกลูทีนิน สายพันธุ์ 168-2006, 172-2006 และ LPAI-15 โดยใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ Histidine Tag

เลนที่ M Protein Marker (Fermentas, U.S.A) ผสมกับ cell infected virus (62 กิโลดาลตัน)

เลนที่ 1 Rice Protein with Histidine Tag (73 กิโลดาลตัน)

เลนที่ 2-4 โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮิสแท็กกลูทีนิน สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 6,7 และ 9 ตามลำดับ

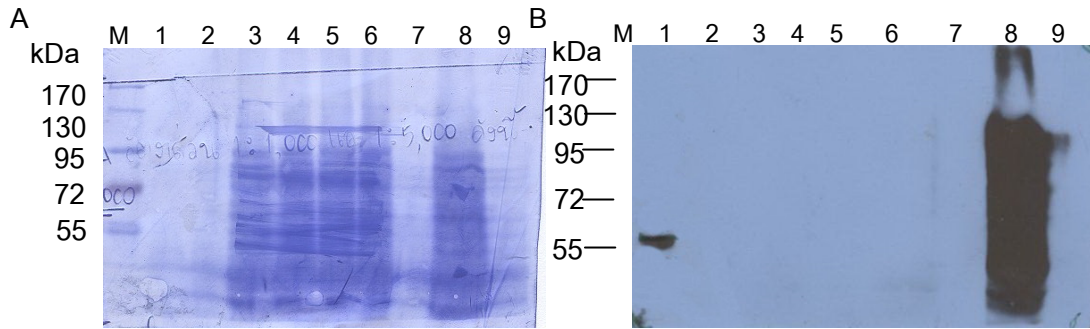
เลนที่ 5-7 โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮิสแท็กกลูทีนิน สายพันธุ์ LPAI โคลนที่ 1-3 ตามลำดับ

เลนที่ 8-9 โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮิสแท็กกลูทีนิน สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38-39 ตามลำดับ

จากผลดังกล่าวข้างต้น สามารถสรุปได้ 2 กรณี กรณีแรก คือ รีคอมบิแนนท์ยีสต์ไม่แสดงออกโปรตีนฮีมแอกกลูตินิน ส่วนกรณีสอง คือ รีคอมบิแนนท์ยีสต์มีการแสดงออกโปรตีนฮีมแอกกลูตินินโดยสร้างแล้วเก็บไว้ในเซลล์ แต่ไม่สามารถยืนยันผลโดยใช้ western blotting ที่ใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Histidine tag ได้ ซึ่งแสดงว่าโปรตีนดังกล่าวอาจจะไม่มีส่วนของ Histidine tag ดังนั้นจึงได้ทำการทดสอบซ้ำโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนฮีมแอกกลูตินิน

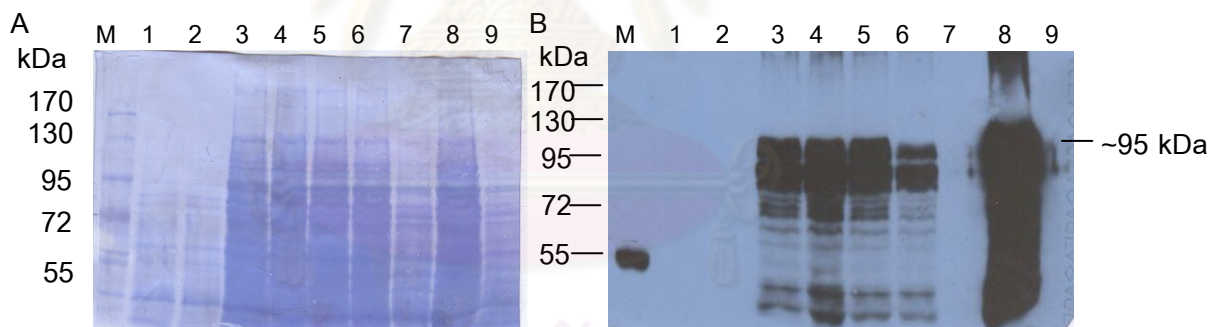
เมื่อทำการวิเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ด้วยวิธี SDS-PAGE และยืนยันผลด้วยวิธี western blotting โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนฮีมแอกกลูตินิน เปรียบเทียบกับ cell infected virus ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มีฮีมแอกกลูตินิน (รูปที่ 4.13) พบว่ารีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มีฮีมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 พบว่า เกิดสัญญาณแถบของโปรตีนขนาดประมาณ 95 กิโลดาลตันเกิดขึ้น และมีลักษณะเป็นรอย smear ซึ่งอาจเกิดจากโปรตีนฮีมแอกกลูตินินถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอสภายในเซลล์ยีสต์ นอกจากนี้ขนาดของโปรตีนฮีมแอกกลูตินินที่คาดไว้ประมาณ 62 กิโลดาลตัน แต่ในผลการทดลองพบขนาดประมาณ 95 กิโลดาลตัน อาจเป็นไปได้ว่าโปรตีนดังกล่าวเกิดกระบวนการเติมหมู่น้ำตาล ทำให้ขนาดของโปรตีนเพิ่มขึ้น จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่มีฮีมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 สามารถแสดงออกของโปรตีนฮีมแอกกลูตินินภายในเซลล์ของยีสต์และสามารถยืนยันผลด้วยวิธี western blotting โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนฮีมแอกกลูตินิน จึงนำสภาวะที่ใช้ในการทดลองดังกล่าวมาใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป โดยหลังจากนั้นได้ทำการทดลองเพื่อสังเกตว่าเซลล์รีคอมบิแนนท์ยีสต์สายพันธุ์อื่น ๆ สามารถแสดงออกของโปรตีนฮีมแอกกลูตินินได้หรือไม่ โดยใช้โปรตีนภายในเซลล์ของยีสต์สายพันธุ์ต่าง ๆ มาวิเคราะห์โดย SDS-PAGE และ western blotting โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนฮีมแอกกลูตินิน แสดงดังรูปที่ 4.14

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.13 SDS-PAGE (A) และ western blotting (B) ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 168-2006, 172-2006 และ LPAI-15 โดยใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนฮีโมแอกกลูตินิน

- เลนที่ M Protein Marker (Fermentas, U.S.A) ผสมกับ cell infected virus (62 กิโลดาลตัน)  
 เลนที่ 1 Rice Protein with Histidine Tag (73 กิโลดาลตัน)  
 เลนที่ 2-4 โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 6,7 และ 9 ตามลำดับ  
 เลนที่ 5-7 โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ LPAI โคลนที่ 1-3 ตามลำดับ  
 เลนที่ 8-9 โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38-39 ตามลำดับ



รูปที่ 4.14 SDS-PAGE (A) และ western blotting (B) ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 168-2006, 172-2006 และ LPAI-15 โดยใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนฮีโมแอกกลูตินิน

- เลนที่ M Protein Marker (Fermentas, U.S.A) ผสมกับ cell infected virus (62 กิโลดาลตัน)  
 เลนที่ 1-4 โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ LPAI-15 โคลนที่ 1-4 ตามลำดับ  
 เลนที่ 5-7 โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 1-3 ตามลำดับ  
 เลนที่ 8-9 โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 และ 40



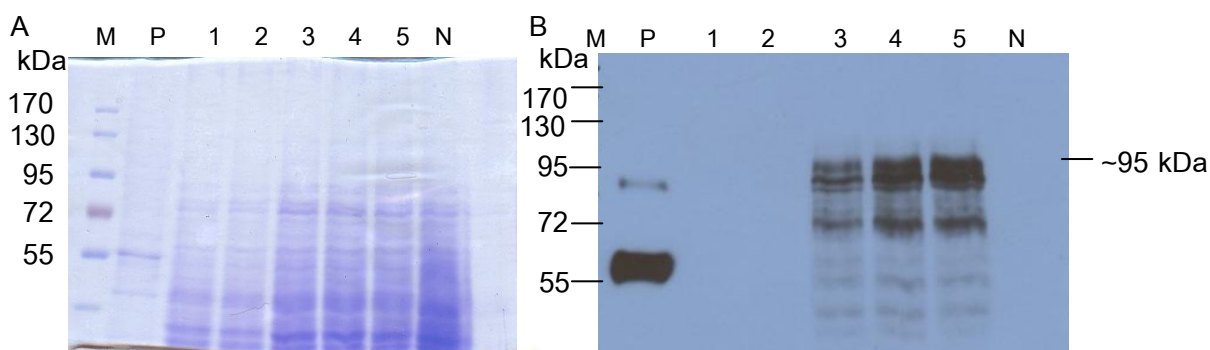
จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ารีคอมบิแนนท์ยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถ แสดงออก โปรตีนฮีมแอกกลูตินิน แต่เก็บไว้ในเซลล์ ซึ่งโปรตีนที่แสดงออกนั้นสามารถตรวจสอบได้โดยใช้ แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนฮีมแอกกลูตินิน มีขนาดประมาณ 95 กิโลดาลตัน นอกจากนี้ ยังพบแถบสัญญาณโปรตีนขนาดเล็ก ซึ่งอาจเกิดจากโปรตีนดังกล่าวถูกย่อยโดยเอนไซม์โปรตีเอส

ดังนั้น จึงได้ทำการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์ยีสต์ สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2, สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 และสายพันธุ์ LPAl-15 โคลนที่ 4 นำไปศึกษาความเข้มข้นของเมทานอลและ จำนวนวันที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของโปรตีนฮีมแอกกลูตินินในระดับขวดเขย่าต่อไป

#### 4.4 การศึกษาความเข้มข้นของเมทานอลและจำนวนวันที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของ โปรตีนฮีมแอกกลูตินินในระดับขวดเขย่า

จากการทดลองข้างต้นได้ทำการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์ยีสต์ สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2, สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 และสายพันธุ์ LPAl-15 โคลนที่ 4 เพื่อนำมาศึกษาความเข้มข้นและ จำนวนวันที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีนฮีมแอกกลูตินิน

ขั้นแรก ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแสดงออก โดยทำการแปรความเข้มข้นตั้งแต่ 1% - 5% (v/v) ของเมทานอลที่ใช้ในการชักนำให้เกิดการแสดงออก เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการ สกัดโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ และทำการวิเคราะห์โปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE และ ทำการยืนยันผลโดยใช้ western blotting เปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่มีพลาสมิด pPICZαA เพียงอย่างเดียว จากการทดลองพบว่ารีคอมบิแนนท์ยีสต์สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 เกิด สัญญาณแถบของโปรตีนขนาดประมาณ 95 กิโลดาลตันเกิดขึ้น และมีลักษณะเป็นรอย smear ซึ่ง อาจเกิดจากโปรตีนฮีมแอกกลูตินินถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอสภายในเซลล์ยีสต์ เมื่อพิจารณาถึง ความเข้มข้นของเมทานอลที่เหมาะสมในการแสดงออก พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเมทานอล มากยิ่งขึ้น ความเข้มของสัญญาณแถบของโปรตีนมีความเข้มเพิ่มมากยิ่งขึ้นเช่นเดียวกัน ในขณะที่ รีคอมบิแนนท์ยีสต์ pPICZαA ที่ผ่านการชักนำไม่มีสัญญาณแถบของโปรตีนฮีมแอกกลูตินินเกิดขึ้น (รูปที่ 4.15) จากผลการทดลองจึงเลือก ความเข้มข้น 4%(v/v) เมทานอล นำมาศึกษาจำนวนวันที่ เหมาะสมในการแสดงออกต่อไป



รูปที่ 4.15 SDS-PAGE (A) และ western blotting (B) ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ยีสต์สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 ที่ผ่านการชักนำด้วย 1%(v/v)-5%(v/v) เมทานอล เป็นเวลา 7 วัน

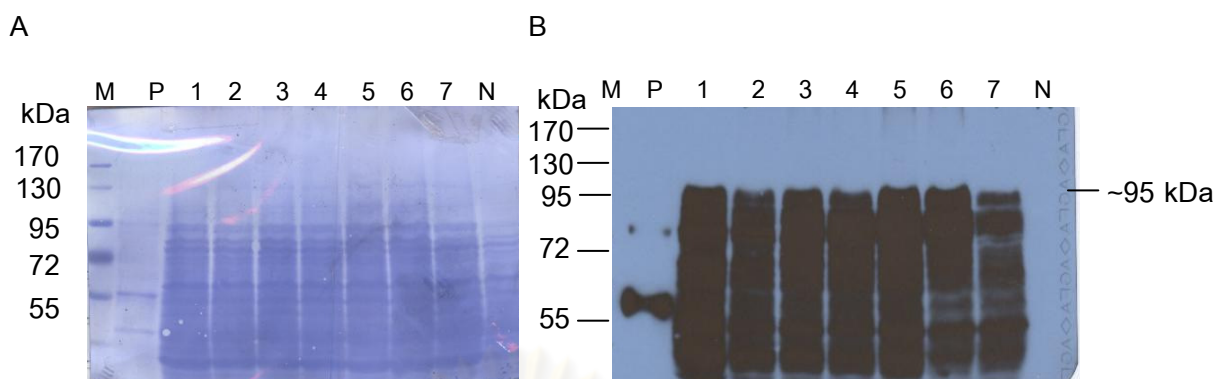
เลนที่ M Protein Marker (Fermentas, U.S.A)

เลนที่ P cell infected virus (62 กิโลดาลตัน)

เลนที่ 1-5 โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินินสายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 ที่ผ่านการชักนำด้วยเมทานอลความเข้มข้น 1%(v/v)-5%(v/v) ตามลำดับ เป็นเวลา 7 วัน

เลนที่ N โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มีพลาสมิด pPICZα ที่ผ่านการชักนำด้วยเมทานอลเข้มข้น 3% (v/v) เป็นเวลา 7 วัน

การศึกษาจำนวนวันที่เหมาะสม ทำโดยการแปรจำนวนวันที่ใช้ในการบ่มให้แสดงออกด้วยการชักนำด้วย 4%(v/v) เมทานอล ซึ่งแปรจำนวนวัน 1 วัน, 2 วัน, 3 วัน, 4 วัน, 5 วัน, 6 วัน และ 7 วัน หลังจากผ่านการชักนำจึงทำการเก็บเซลล์ และสกัดโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ จากนั้นวิเคราะห์โปรตีนที่สกัดได้โดย SDS-PAGE และยืนยันผลอีกครั้งโดยใช้ western blotting เปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่มีพลาสมิด pPICZα เพียงอย่างเดียว จากการทดลองพบว่ารีคอมบิแนนท์ยีสต์ 168-2006 โคลนที่ 2 พบสัญญาณแถบของโปรตีนขนาดประมาณ 95 กิโลดาลตันเกิดขึ้น และมีลักษณะเป็นรอย smear ซึ่งอาจเกิดจากโปรตีนฮีโมแอกกลูตินินถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอสภายในเซลล์ยีสต์เมื่อพิจารณาถึงจำนวนวันที่เหมาะสมในการแสดงออก พบว่าโปรตีนฮีโมแอกกลูตินินมีการแสดงออกตั้งแต่วันแรกที่เริ่มบ่มจนถึงวันสุดท้ายของการบ่ม ในขณะที่รีคอมบิแนนท์ยีสต์ pPICZα ที่ผ่านการชักนำไม่พบสัญญาณแถบของโปรตีนเกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16 SDS-PAGE (A) และ western blotting (B) ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ยีสต์สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 ที่ผ่านการชักนำด้วย 4% (v/v) เมทานอล เป็นเวลา 1-7 วัน ตามลำดับ

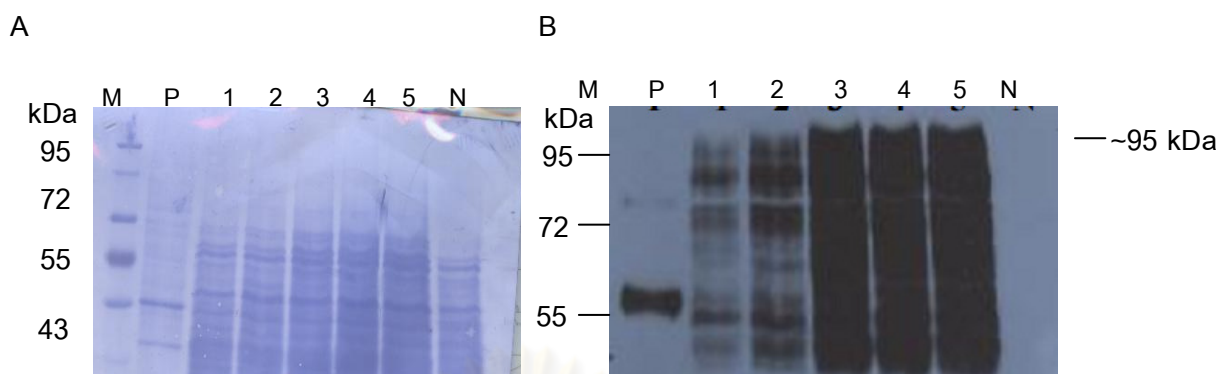
เลนที่ M Protein Marker (Fermentas, U.S.A)

เลนที่ P cell infected virus (62 กิโลดาลตัน)

เลนที่ 1-7 โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮีแมกกลูทินินสายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 ที่ผ่านการชักนำด้วยเมทานอลความเข้มข้น 4% (v/v) เป็นเวลา 1-7 วัน ตามลำดับ

เลนที่ N โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มีพลาสมิด pPICZαA ที่ผ่านการชักนำด้วยเมทานอลเข้มข้น 4%(v/v) เป็นเวลา 7 วัน

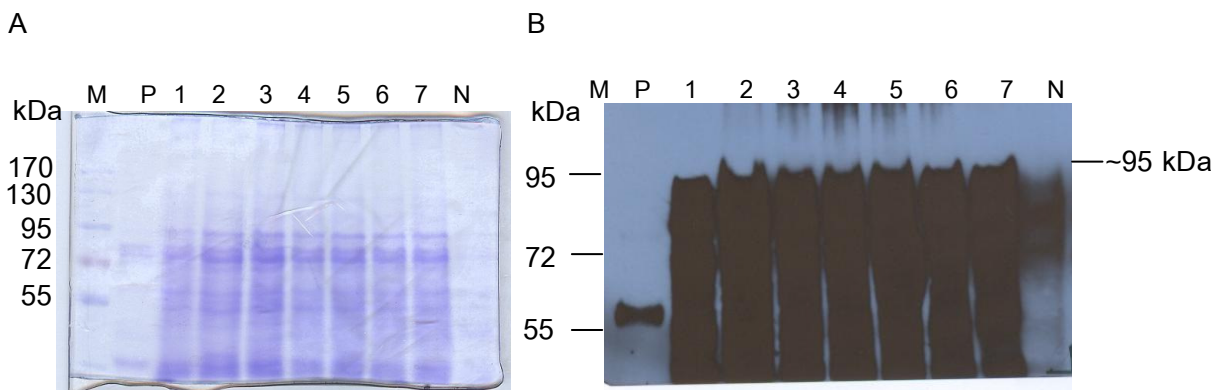
ต่อมาศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีสต์สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 โดยทำการแปรความเข้มข้นตั้งแต่ 1% - 5% (v/v) ของเมทานอลที่ใช้ในการชักนำให้เกิดการแสดงออก เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการสกัดโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ และทำการวิเคราะห์โปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE และทำการยืนยันผลโดยใช้ western blotting เปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่มีพลาสมิด pPICZαA เพียงอย่างเดียว จากการทดลองพบว่ารีคอมบิแนนท์ยีสต์สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 เกิดสัญญาณแถบของโปรตีนขนาดประมาณ 95 กิโลดาลตันเกิดขึ้น และมีลักษณะเป็นรอย smear ซึ่งอาจเกิดจากโปรตีนฮีแมกกลูทินินถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอสภายในเซลล์ยีสต์ เมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้นของเมทานอลที่เหมาะสมในการแสดงออก พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเมทานอลมากยิ่งขึ้น ความเข้มของสัญญาณแถบของโปรตีนมีความเข้มเพิ่มมากยิ่งขึ้นเช่นเดียวกัน ในขณะที่รีคอมบิแนนท์ยีสต์ pPICZαA ที่ผ่านการชักนำไม่มีสัญญาณแถบของโปรตีนฮีแมกกลูทินินเกิดขึ้น (รูปที่ 4.17) จากผลการทดลองจึงเลือก ความเข้มข้น 4%(v/v) เมทานอล นำมาศึกษาจำนวนวันที่เหมาะสมในการแสดงออกต่อไป



รูปที่ 4.17 SDS-PAGE (A) และ western blotting (B) ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ยีสต์สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 ที่ผ่านการชักนำด้วย 1%(v/v)-5%(v/v) เมทานอล เป็นเวลา 7 วัน

- เลนที่ M Protein Marker (Fermentas, U.S.A)
- เลนที่ P cell infected virus (62 กิโลดาลตัน)
- เลนที่ 1-5 โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินินสายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 ที่ผ่านการชักนำด้วยเมทานอลความเข้มข้น 1%(v/v)-5%(v/v) ตามลำดับ เป็นเวลา 7 วัน
- เลนที่ N โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มีพลาสมิด pPICZαA ที่ผ่านการชักนำด้วยเมทานอลเข้มข้น 3%(v/v) เป็นเวลา 7 วัน

การศึกษาจำนวนวันที่เหมาะสม ทำโดยการแปรจำนวนวันที่ใช้ในการบ่มให้แสดงออกด้วยการชักนำด้วย 4%(v/v) เมทานอล ซึ่งแปรจำนวนวัน 1 วัน, 2 วัน, 3 วัน, 4 วัน, 5 วัน, 6 วัน และ 7 วัน หลังจากผ่านการชักนำจึงทำการเก็บเซลล์และสกัดโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ จากนั้นวิเคราะห์โปรตีนที่สกัดได้โดย SDS-PAGE และยืนยันผลอีกครั้งโดยใช้ western blotting เปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่มีพลาสมิด pPICZαA เพียงอย่างเดียว จากการทดลองพบว่ารีคอมบิแนนท์ยีสต์ 172-2006 โคลนที่ 38 เกิดสัญญาณแถบของโปรตีนฮีโมแอกกลูตินินประมาณ 95 กิโลดาลตันและเกิดสัญญาณแถบของโปรตีนขนาดเล็ก ๆ เกิดขึ้นซึ่งอาจเกิดจากโปรตีนถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอสภายในเซลล์ยีสต์ เมื่อพิจารณาถึงจำนวนวันที่เหมาะสมในการแสดงออกแล้วพบว่าการแสดงออกของโปรตีนฮีโมแอกกลูตินินตั้งแต่วันแรกที่เริ่มบ่มจนถึงวันสุดท้ายของการบ่มเมื่อพิจารณาความเข้มของสัญญาณแถบโปรตีนแล้ว พบว่าสัญญาณแถบของโปรตีนมีความเข้มเท่า ๆ กัน ในขณะที่รีคอมบิแนนท์ยีสต์ pPICZαA ที่ผ่านการชักนำไม่มีสัญญาณแถบของโปรตีนเกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.18

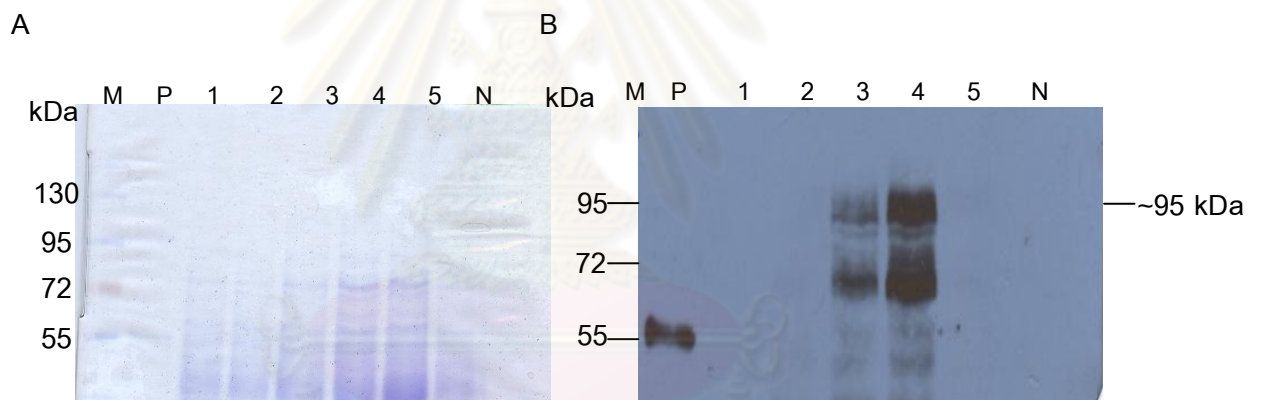


รูปที่ 4.18 SDS-PAGE (A) และ western blotting (B) ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ยีสต์สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 ที่ผ่านการชักนำด้วย 4%(v/v) เมทานอล เป็นเวลา 1-7 วัน ตามลำดับ

- เลนที่ M Protein Marker (Fermentas, U.S.A)
- เลนที่ P cell infected virus (62 กิโลดาลตัน)
- เลนที่ 1-7 โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินินสายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 ที่ผ่านการชักนำด้วยเมทานอลความเข้มข้น 4%(v/v) เป็นเวลา 1-7 วัน ตามลำดับ
- เลนที่ N โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มีพลาสมิด pPICZα ที่ผ่านการชักนำด้วยเมทานอลเข้มข้น 4%(v/v) เป็นเวลา 7 วัน

ในการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ สายพันธุ์ LPAI-15 โคลนที่ 4 โดยทำการแปรความเข้มข้นตั้งแต่ 1% - 5% (v/v) ของเมทานอลที่ใช้ในการชักนำให้เกิดการแสดงออก เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการสกัดโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ และทำการวิเคราะห์โปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE และทำการยืนยันผลโดยใช้ western blotting เปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่มีพลาสมิด pPICZα เพียงอย่างเดียว จากการทดลองพบว่ารีคอมบิแนนท์ยีสต์สายพันธุ์ LPAI-15 โคลนที่ 4 เกิดสัญญาณแถบของโปรตีนฮีโมแอกกลูตินินประมาณ 95 กิโลดาลตันและเกิดสัญญาณแถบของโปรตีนขนาดเล็ก ๆ เกิดขึ้นซึ่งอาจเกิดจากโปรตีนถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอสภายในเซลล์ยีสต์ เมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้นของเมทานอลที่เหมาะสมในการแสดงออกแล้ว พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเมทานอลมากยิ่งขึ้นความเข้มของสัญญาณแถบของโปรตีนมีความเข้มเพิ่มมากยิ่งขึ้นเช่นเดียวกัน ในขณะที่รีคอมบิแนนท์ยีสต์ pPICZα ที่ผ่านการชักนำไม่มีสัญญาณแถบของโปรตีนฮีโมแอกกลูตินินเกิดขึ้น (รูปที่ 4.19) จากผลการทดลองจึงเลือกความเข้มข้น 4%(v/v) เมทานอล นำมาศึกษาจำนวนวันที่เหมาะสมในการแสดงออกต่อไป

การศึกษาจำนวนวันที่เหมาะสม ทำโดยการแปรจำนวนวันที่ใช้ในการบ่มให้แสดงออกด้วยการชักนำด้วย 4%(v/v) เมทานอล ซึ่งแปรจำนวนวัน 1 วัน, 2 วัน, 3 วัน, 4 วัน, 5 วัน, 6 วัน และ 7 วัน หลังจากผ่านการชักนำจึงทำการเก็บเซลล์และสกัดโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ จากนั้นวิเคราะห์โปรตีนที่สกัดได้โดย SDS-PAGE และยืนยันผลอีกครั้งโดยใช้ western blotting เปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่มีพลาสมิด pPICZα เพียงอย่างเดียว จากการทดลองพบว่ารีคอมบิแนนท์ยีสต์ LPAI-15 โคลนที่ 4 เกิดสัญญาณแถบของโปรตีนประมาณ 95 กิโลดาลตันและเกิดแถบของโปรตีนขนาดเล็ก ๆ เกิดขึ้นซึ่งอาจเกิดจากโปรตีนถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอสภายในเซลล์ยีสต์ เมื่อพิจารณาถึงจำนวนวันที่เหมาะสมในการแสดงออกแล้วพบว่ามี การแสดงออกของโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินตั้งแต่วันแรกที่เริ่มบ่มจนถึงวันสุดท้ายของการบ่ม เมื่อพิจารณาความเข้มของสัญญาณแถบของโปรตีนแล้ว พบว่าสัญญาณแถบของโปรตีนมีความเข้มเท่า ๆ กัน ในขณะที่รีคอมบิแนนท์ยีสต์ pPICZα ที่ผ่านการชักนำไม่มีสัญญาณแถบของโปรตีนเกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.20



รูปที่ 4.19 SDS-PAGE (A) และ western blotting (B) ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ยีสต์สายพันธุ์ LPAI-15 โคลนที่ 4 ที่ผ่านการชักนำด้วย 1%(v/v)-5%(v/v) เมทานอล เป็นเวลา 7 วัน

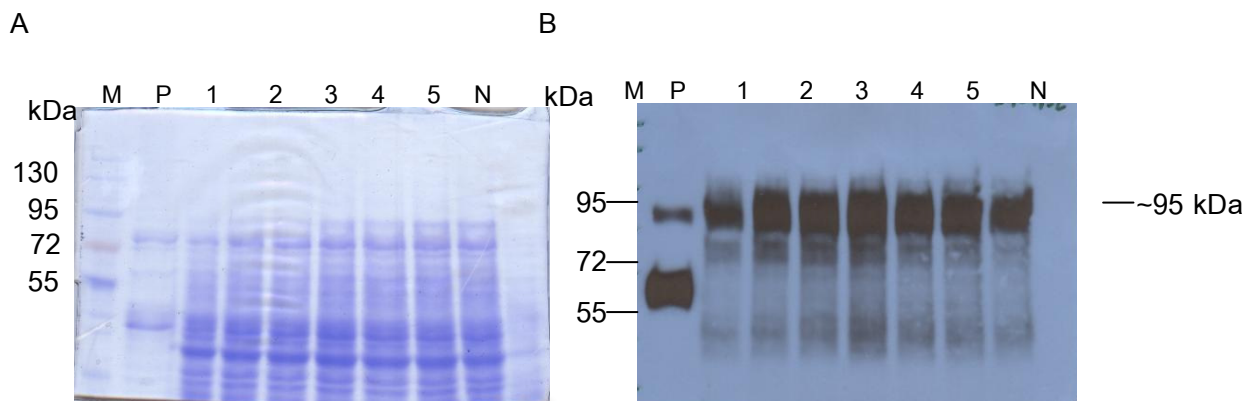
เลนที่ M Protein Marker (Fermentas, U.S.A)

เลนที่ P cell infected virus (62 กิโลดาลตัน)

เลนที่ 1-5 โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มีฮีมาแอกกลูตินิน

สายพันธุ์ LPAI-15 โคลนที่ 4 ที่ผ่านการชักนำด้วยเมทานอลความเข้มข้น 1%(v/v)-5%(v/v) ตามลำดับ เป็นเวลา 7 วัน

เลนที่ N โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มีพลาสมิด pPICZα ที่ผ่านการชักนำด้วยเมทานอลเข้มข้น 3%(v/v) เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 4.20 SDS-PAGE (A) และ western blotting (B) ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ยีสต์สายพันธุ์ LPAI-15 โคลนที่ 4 ที่ผ่านการชักนำด้วย 4%(v/v) เมทานอลเป็นเวลา 1-7 วัน ตามลำดับ

- เลนที่ M Protein Marker (Fermentas, U.S.A)
- เลนที่ P cell infected virus (62 กิโลดาลตัน)
- เลนที่ 1-5 โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินินสายพันธุ์ LPAI-15 โคลนที่ 4 ที่ผ่านการชักนำด้วยเมทานอลความเข้มข้น 4%(v/v) เป็นเวลา 1-7 วัน ตามลำดับ
- เลนที่ N โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มีพลาสมิด pPICZCUA ที่ผ่านการชักนำด้วยเมทานอลเข้มข้น 4%(v/v) เป็นเวลา 7 วัน

จากผลการทดลองทั้งหมดพบว่าทั้ง HPAI และ LPAI จะเริ่มมีการแสดงออกของโปรตีนฮีโมแอกกลูตินินเมื่อถูกชักนำด้วย 3-4 %(v/v) เมทานอล และเริ่มมีการแสดงออกเมื่อบ่มเป็นเวลา 1 วันเป็นต้นไป ดังนั้นจึงเลือกใช้ 4%(v/v) เมทานอลและบ่มเป็นระยะเวลา 2 วัน นำไปทำการทดลองขั้นตอนต่อไป

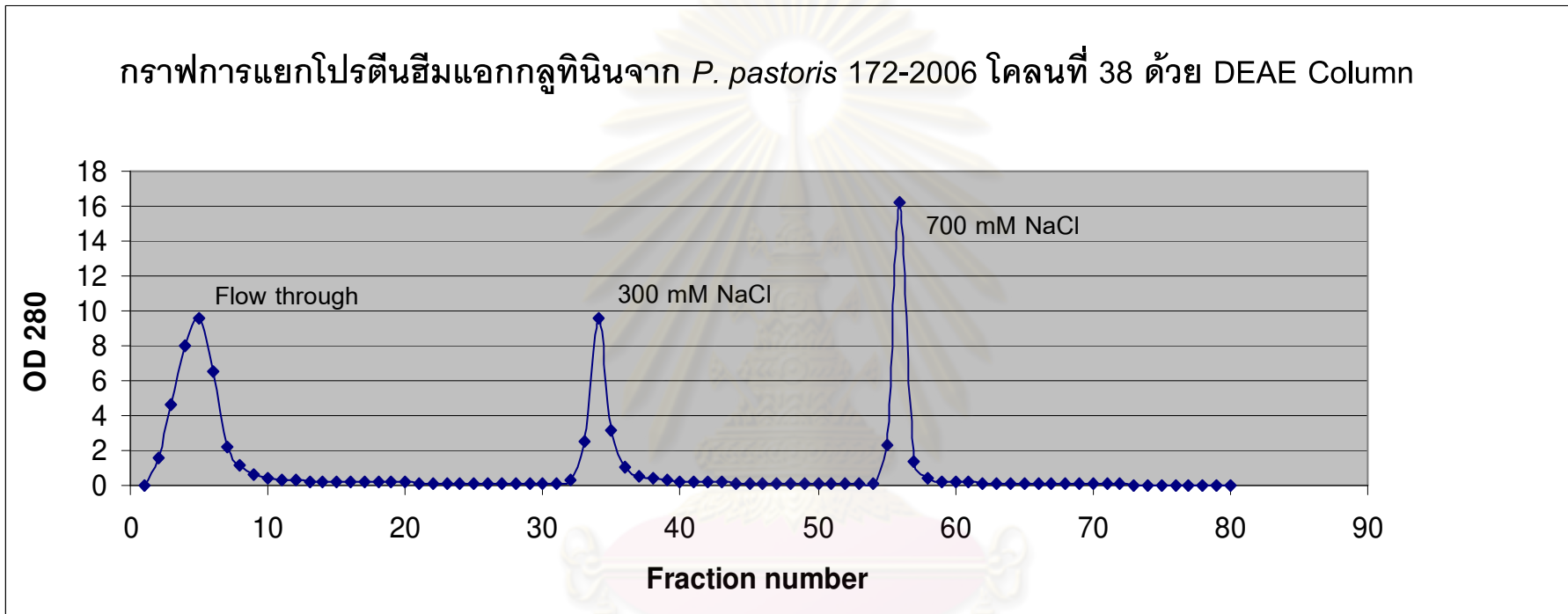
ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 4.5 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนฮีมแอกกลูตินิน

การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์จะเริ่มต้นด้วยการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ในระดับขวดเขย่า โดยเลี้ยงในอาหารที่ชักนำให้เกิดการแสดงออก (อาหาร BMMY ภาคผนวก ก8) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเก็บเซลล์และสกัดโปรตีนโดยใช้เครื่อง sonicator เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 4 รอบ จากนั้นนำโปรตีนที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

รีคอมบิแนนท์ยีสต์สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 เป็นสายพันธุ์แรกในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยการใช้คอลัมน์ Ion Exchange chromatography (DEAE Column) ผลการทดลองเป็นดังรูปที่ 4.21 จากกราฟจะเห็นได้ว่าเมื่อนำโปรตีนฮีมแอกกลูตินินจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 มาทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่าน DEAE Column จะพบพีคของโปรตีนใน flow through, 300 mM NaCl และ 700 mM NaCl ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์โปรตีนในแต่ละ fraction โดยใช้ SDS-PAGE และ western blotting

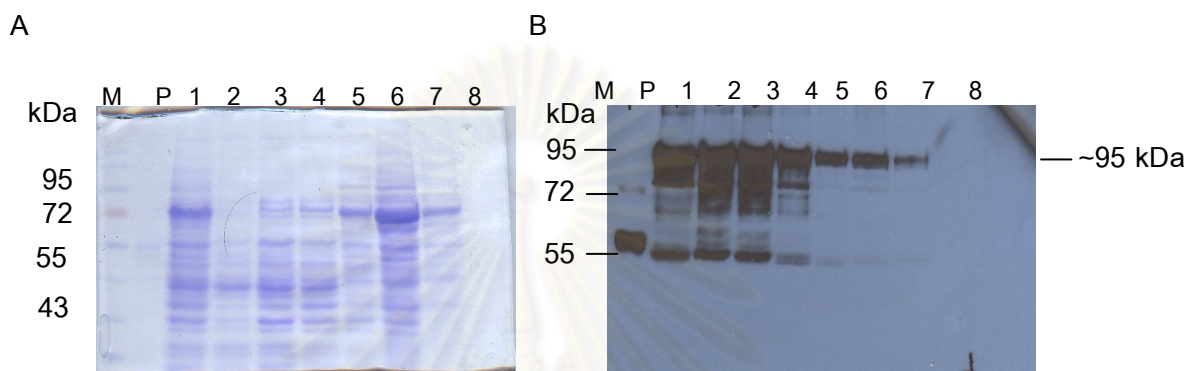




รูปที่ 4.21 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มีฮีมาแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 โดยใช้ DEAE Column

ศูนย์วิทยาศาสตร์การ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

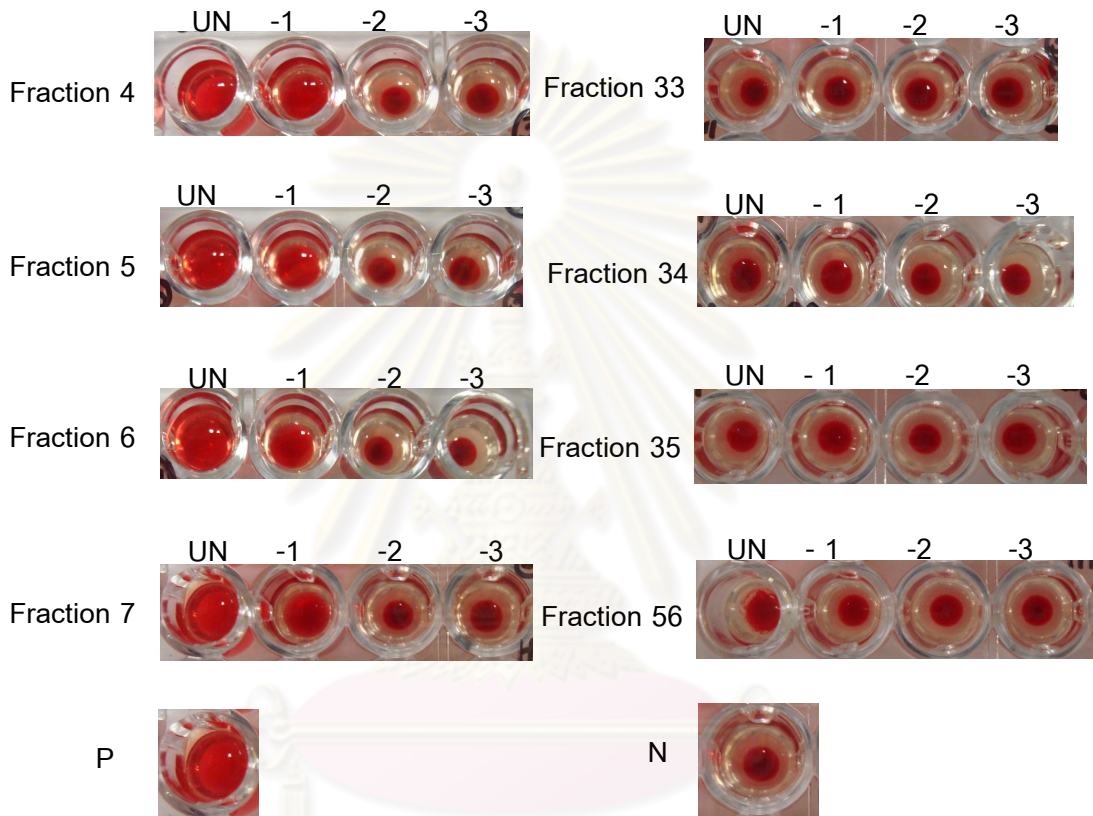
หลังจากนำ fraction ของ flow through, 300 mM NaCl และ 700 mM NaCl ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร มาทำการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE และ western blotting พบว่าพบแถบของโปรตีนใน fraction ของ flow through (fraction ที่ 4-7) และ 300 mM NaCl (fraction ที่ 33-35) แต่ไม่พบแถบโปรตีนใน fraction ของ 700 mM NaCl (fraction ที่ 56) ดังแสดงในรูปที่ 4.22



รูปที่ 4.22 SDS-PAGE (A) และ western blotting (B) ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ยีสต์สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column

- |            |  |
|------------|--|
| เลนที่ M   | Protein Marker (Fermentas, U.S.A)  |
| เลนที่ P   | cell infected virus (62 กิโลดาลตัน)  |
| เลนที่ 1-4 | โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินินสายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column ส่วนของ Flow through (Fraction 4-7 ตามลำดับ)  |
| เลนที่ 5-7 | โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินินสายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column ส่วนของ 300 mM NaCl (Fraction 33-35 ตามลำดับ) |
| เลนที่ 8   | โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินินสายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column ส่วนของ 700 mM NaCl (Fraction 56)             |

หลังจากนั้นนำมาคัดเลือก โดยใช้คุณสมบัติของโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินในการเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดง (Hemagglutination) จากการทดลองพบว่าโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 หลังจากทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่าน DEAE Column นั้นพบว่า fraction ส่วนของ flow through (Fraction 4-7) เท่านั้นที่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงได้ (รูปที่ 4.23) จึงนำ fraction ดังกล่าวมาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่งด้วย Sephacryl S-200 Column



รูปที่ 4.23 การเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย DEAE Column

หลุมที่ P cell infected virus

หลุมที่ N บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการละลายโปรตีน (20 mM Tris-HCl, pH 8.0)

โดยที่ UN = โปรตีนฮีมาแอกกลูตินินที่ไม่ได้เจือจาง

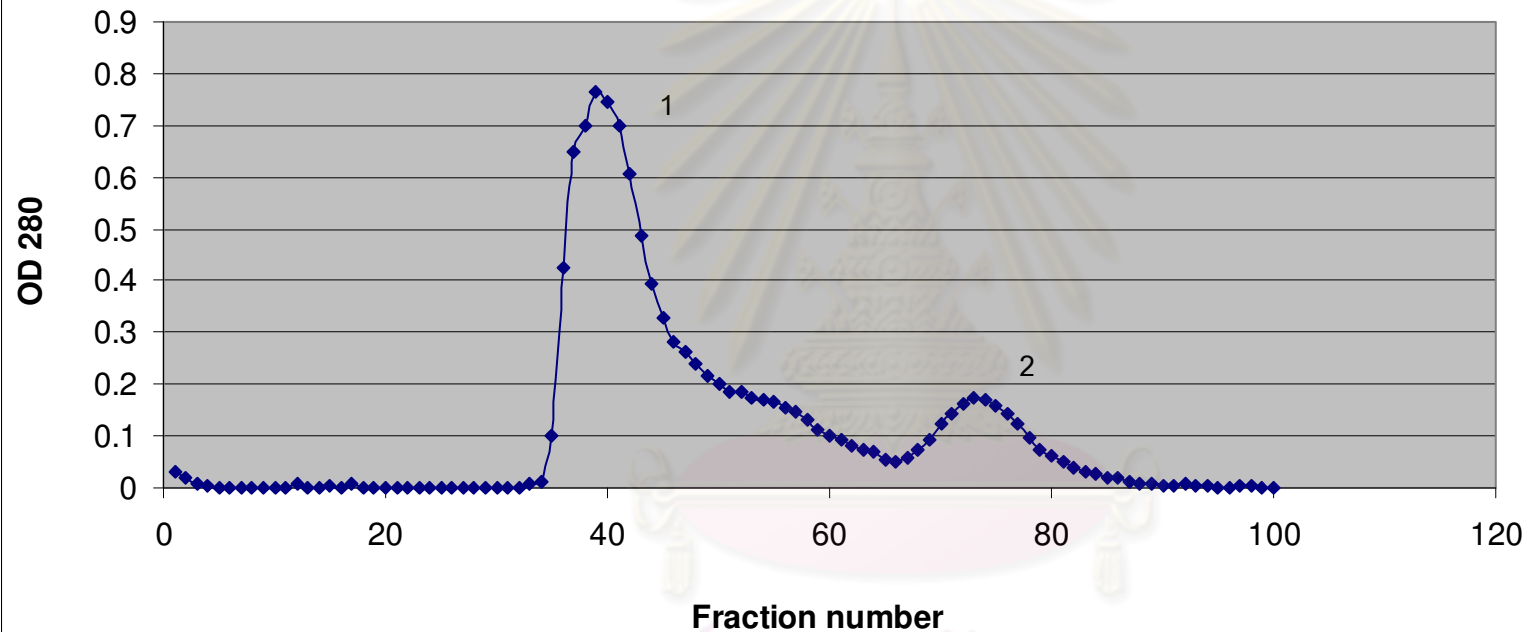
-1 = โปรตีนฮีมาแอกกลูตินินที่เจือจาง 10 เท่า

-2 = โปรตีนฮีมาแอกกลูตินินที่เจือจาง 100 เท่า

-3 = โปรตีนฮีมาแอกกลูตินินที่เจือจาง 1,000 เท่า

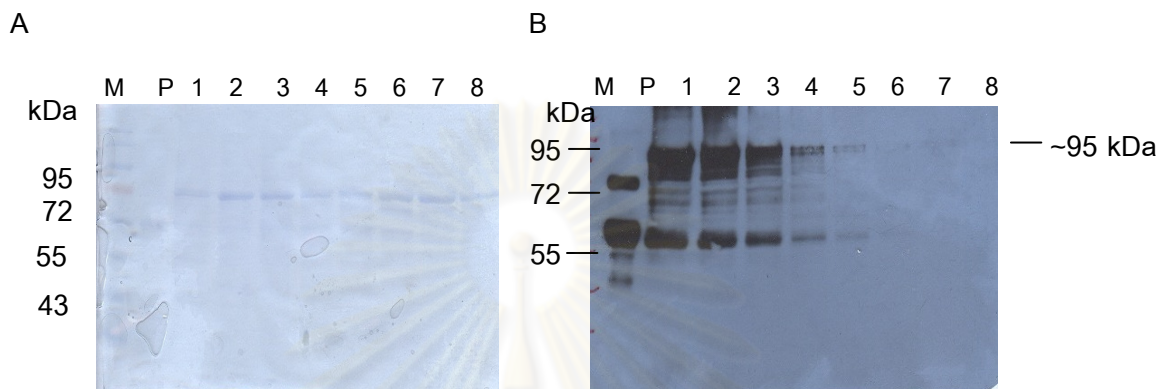
หลังจากนั้นจึงนำโปรตีนในน้ำแต่ละ Fraction ของ Flow through มารวมกัน และทำให้เข้มข้นขึ้น ด้วยการใส่ Millicon จากนั้นนำโปรตีนดังกล่าวมาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วย Sephacryl S-200 Column ซึ่งผลการทดลองพบ พีคของโปรตีนทั้งหมด 2 พีค (รูปที่ 4.24)

กราฟการแยกโปรตีนฮีมแอกกลูตินินจาก *P. pastoris* 172-2006 โคลนที่ 38 ด้วย Sephacryl S-200 Column



รูปที่ 4.24 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มีฮีมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 โดยใช้ Sephacryl S-200 Column

จากกราฟจะเห็นได้ว่าเมื่อนำโปรตีนฮีมแอกกลูตินินจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 มาทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่าน DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column จะพบพีคของโปรตีน 2 พีค จึงทำการวิเคราะห์โปรตีนในแต่ละ fraction ของแต่ละพีค โดยใช้ SDS-PAGE และ western blotting จากผลการทดลอง พบแถบของโปรตีนใน fraction ของของพีคที่ 1 และไม่พบแถบโปรตีนใน fraction ของพีคที่ 2 (รูปที่ 4.25)



รูปที่ 4.25 SDS-PAGE (A) และ western blotting (B) ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ยีสต์สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column

เลนที่ M Protein Marker (Fermentas, U.S.A)

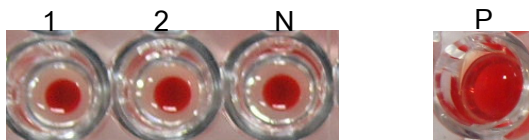
เลนที่ P cell infected virus (62 กิโลดาลตัน)

เลนที่ 1-4 โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มีฮีมแอกกลูตินินสายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column ส่วนของพีค 1 (Fraction 40-43)

เลนที่ 5-8 โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มีฮีมแอกกลูตินินสายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column ส่วนของพีค 2 (Fraction 72-75)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลังจากนั้นนำ Fraction ของพีคแรกมารวมกัน และทำการ dialysis เพื่อขจัด urea ก่อนนำมาทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ซึ่งผลการทดลองพบว่าโปรตีนดังกล่าวไม่ก่อให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้ (รูปที่ 4.26)



**รูปที่ 4.26** การเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column

หลุมที่ P cell infected virus

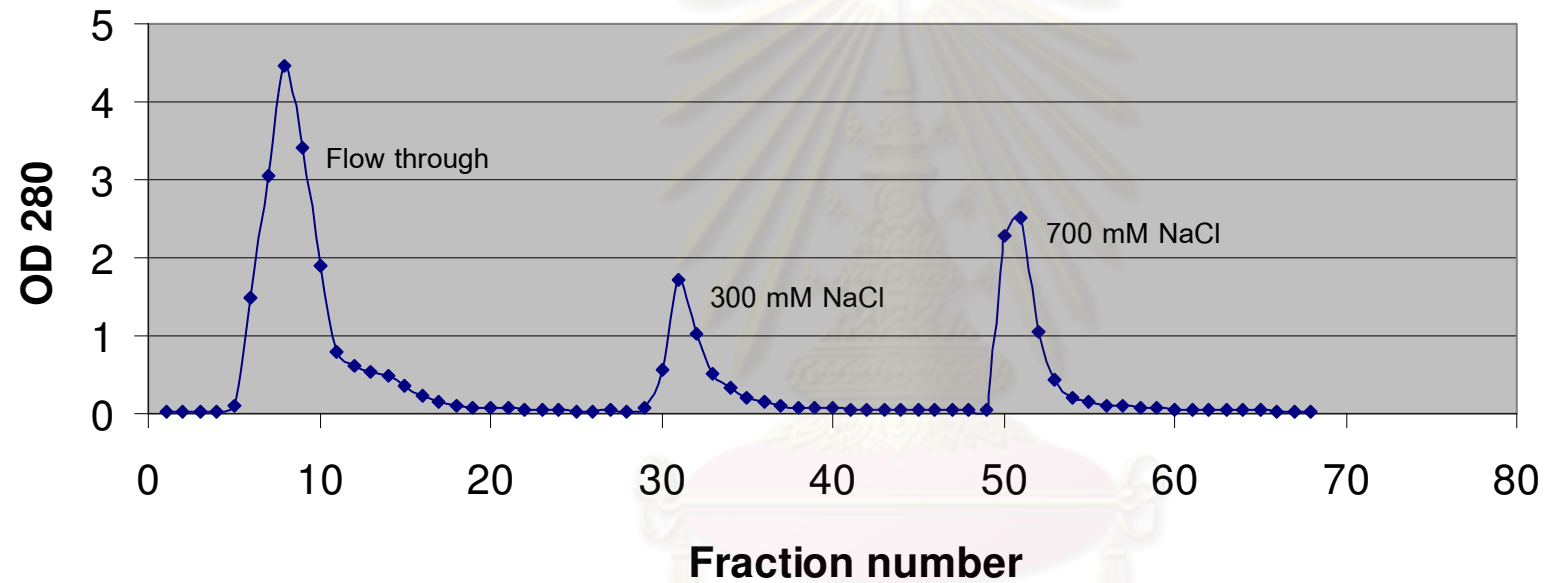
หลุมที่ 1-2 โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มีเยื่อ Hemagglutinin สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column ส่วนของพีคที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

หลุมที่ N บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการละลายโปรตีน (20 mM Tris-HCl, pH 8.0)

เมื่อทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 ด้วยการใช้อัลบั้ม Ion Exchange chromatography (DEAE Column) ผลการทดลองเป็นดังรูปที่ 4.27 จากกราฟจะเห็นได้ว่าเมื่อนำโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 มาทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่าน DEAE Column จะพบพีคของโปรตีนใน flow through, 300 mM NaCl และ 700 mM NaCl ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์โปรตีนในแต่ละ fraction โดยใช้ SDS-PAGE และ western blotting

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

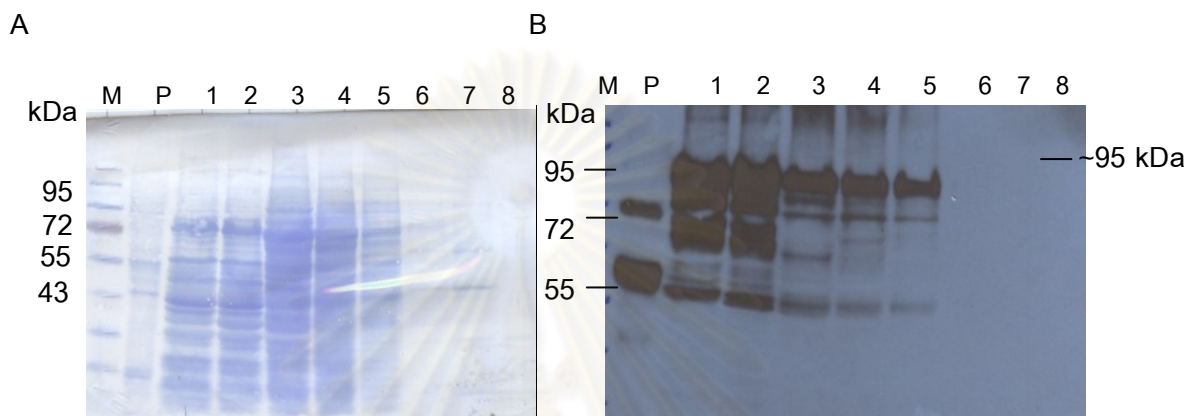
กราฟการแยกโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินจาก *P. pastoris* 168-2006 โคลนที่ 2 ด้วย DEAE Column



รูปที่ 4.27 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มีฮีมาแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 โดยใช้ DEAE Column

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลังจากนำ fraction ของ flow through, 300 mM NaCl และ 700 mM NaCl ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร มาทำการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE และ western blotting พบว่าพบแถบของโปรตีนใน fraction ของ flow through (fraction ที่ 8-9) และ 300 mM NaCl (fraction ที่ 30-32) แต่ไม่พบแถบโปรตีนใน fraction ของ 700 mM NaCl (fraction ที่ 50-52) ดังแสดงในรูปที่ 4.28



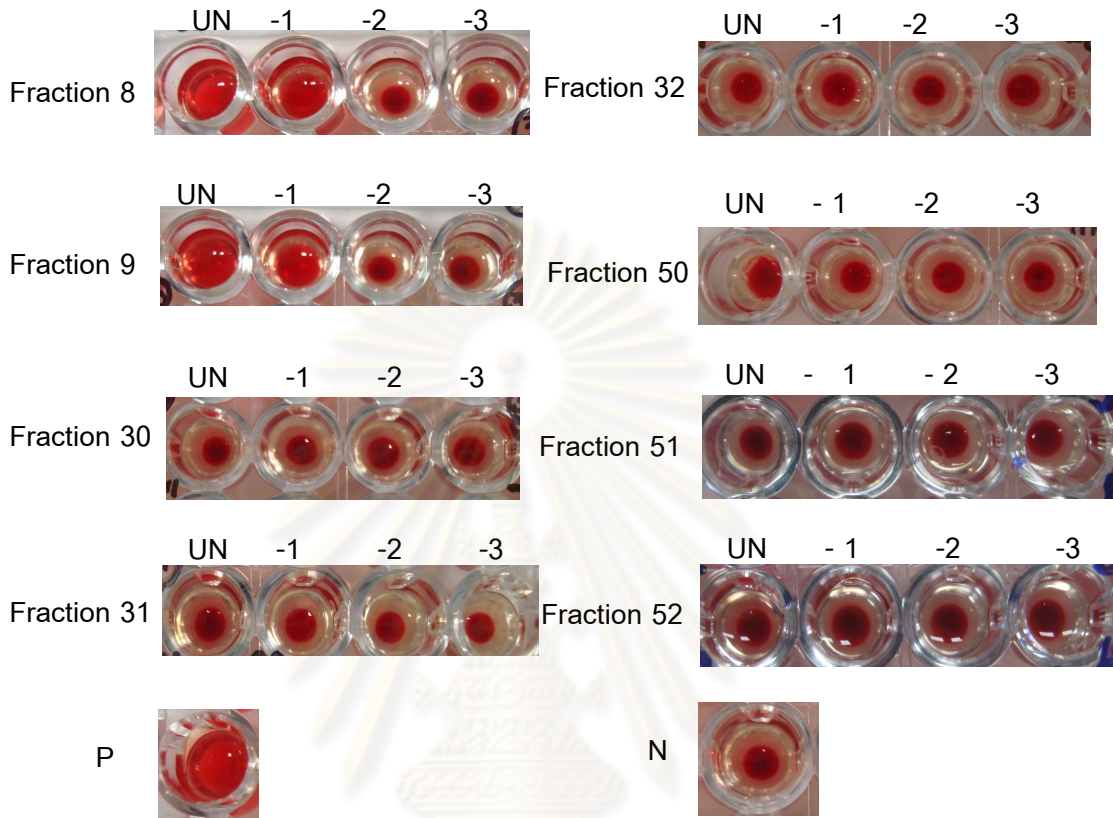
รูปที่ 4.28 SDS-PAGE (A) และ western blotting (B) ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ยีสต์สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column

- |            |   |
|------------|---|
| เลนที่ M   | Protein Marker (Fermentas, U.S.A)   |
| เลนที่ P   | cell infected virus (62 กิโลดาลตัน)   |
| เลนที่ 1-2 | โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีมาแอกกลูตินินสายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column ส่วนของ Flow through (Fraction 8-9 ตามลำดับ)  |
| เลนที่ 3-5 | โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีมาแอกกลูตินินสายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column ส่วนของ 300 mM NaCl (Fraction 30-32 ตามลำดับ) |
| เลนที่ 6-8 | โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีมาแอกกลูตินินสายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column ส่วนของ 700 mM NaCl (Fraction 50-52)          |

หลังจากนั้นนำมาคัดเลือก โดยใช้คุณสมบัติของโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินในการเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดง (Hemagglutination) จากการทดลองพบว่าโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 หลังจากทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่าน DEAE Column นั้นพบว่า fraction ส่วนของ flow through (Fraction 8-9) เท่านั้นที่สามารถทำให้



เกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงได้ (รูปที่ 4.29) จึงนำ fraction ดังกล่าวมาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่งด้วย Sephacryl S-200 Column



รูปที่ 4.29 การเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย DEAE Column

หลุมที่ P cell infected virus

หลุมที่ N บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการละลายโปรตีน (20 mM Tris-HCl, pH 8.0)

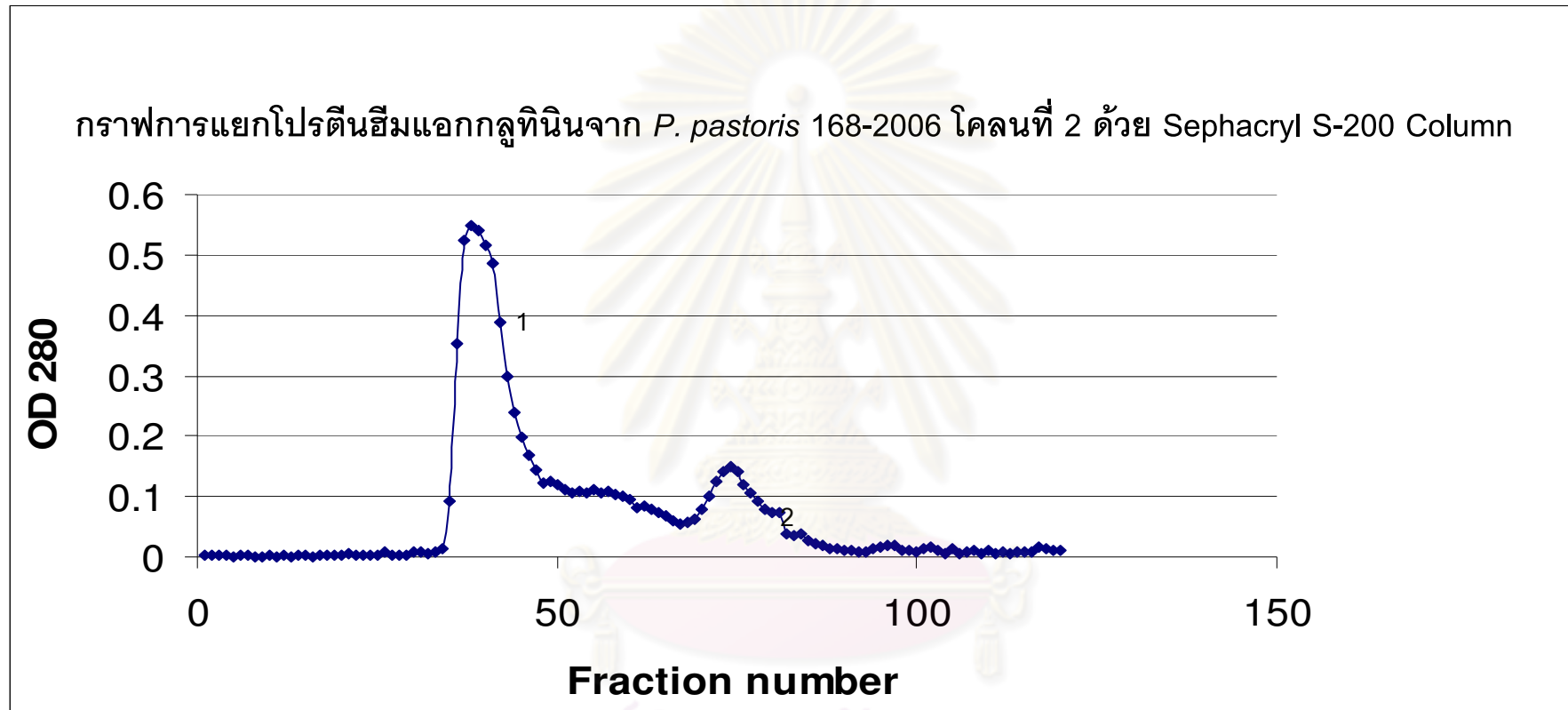
โดยที่ UN = โปรตีนฮีมาแอกกลูตินินที่ไม่ได้เจือจาง

-1 = โปรตีนฮีมาแอกกลูตินินที่เจือจาง 10 เท่า

-2 = โปรตีนฮีมาแอกกลูตินินที่เจือจาง 100 เท่า

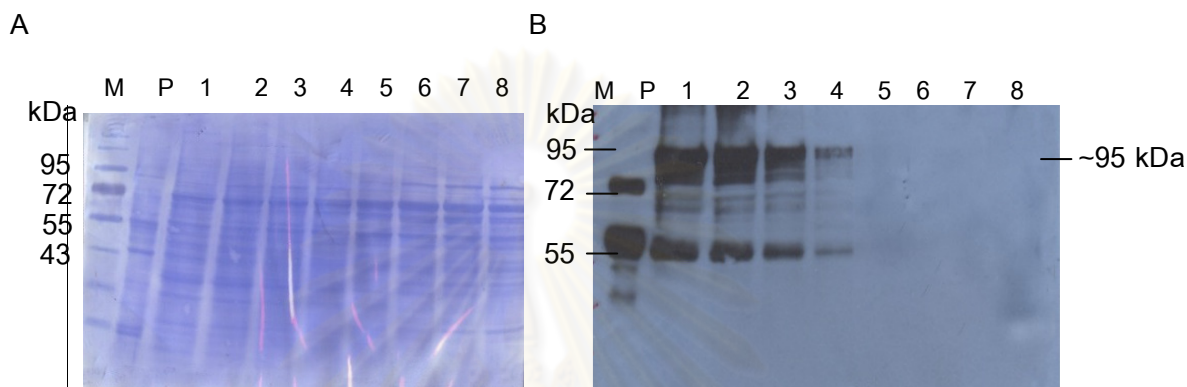
-3 = โปรตีนฮีมาแอกกลูตินินที่เจือจาง 1,000 เท่า

หลังจากนั้นจึงนำโปรตีนในน้ำแต่ละ Fraction ของ Flow through มารวมกัน และทำให้เข้มข้นขึ้น ด้วยการให้ Millicon จากนั้นนำโปรตีนดังกล่าวมาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วย Sephacryl S-200 Column ซึ่งผลการทดลองพบ พีคของโปรตีนทั้งหมด 2 พีค (รูปที่ 4.30)



รูปที่ 4.30 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มีฮีมาแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 โดยใช้ Sephacryl S-200 Column

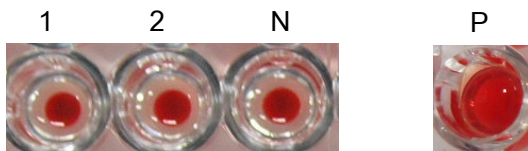
จากกราฟจะเห็นได้ว่าเมื่อนำโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 มาทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่าน DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column จะพบพีคของโปรตีน 2 พีค จึงทำการวิเคราะห์โปรตีนในแต่ละ fraction ของแต่ละพีคโดยใช้ SDS-PAGE และ western blotting จากผลการทดลอง พบแถบของโปรตีนใน fraction ของพีคที่ 1 และไม่พบแถบโปรตีนใน fraction ของพีคที่ 2 (รูปที่ 4.31)



รูปที่ 4.31 SDS-PAGE (A) และ western blotting (B) ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ยีสต์สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column

- เลนที่ M Protein Marker (Fermentas, U.S.A)
- เลนที่ P cell infected virus (62 กิโลดาลตัน)
- เลนที่ 1-4 โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มีฮีมาแอกกลูตินินสายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column ส่วนของพีค 1 (Fraction 37-40)
- เลนที่ 5-8 โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มีฮีมาแอกกลูตินินสายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column ส่วนของพีค 2 (Fraction 70-73)

หลังจากนั้นนำ Fraction ของพีคแรกมารวมกัน และทำการ dialysis เพื่อขจัด urea ก่อนนำมาทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ซึ่งผลการทดลองพบว่าโปรตีนดังกล่าวไม่ก่อให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้ (รูปที่ 4.32)



รูปที่ 4.32 การเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column

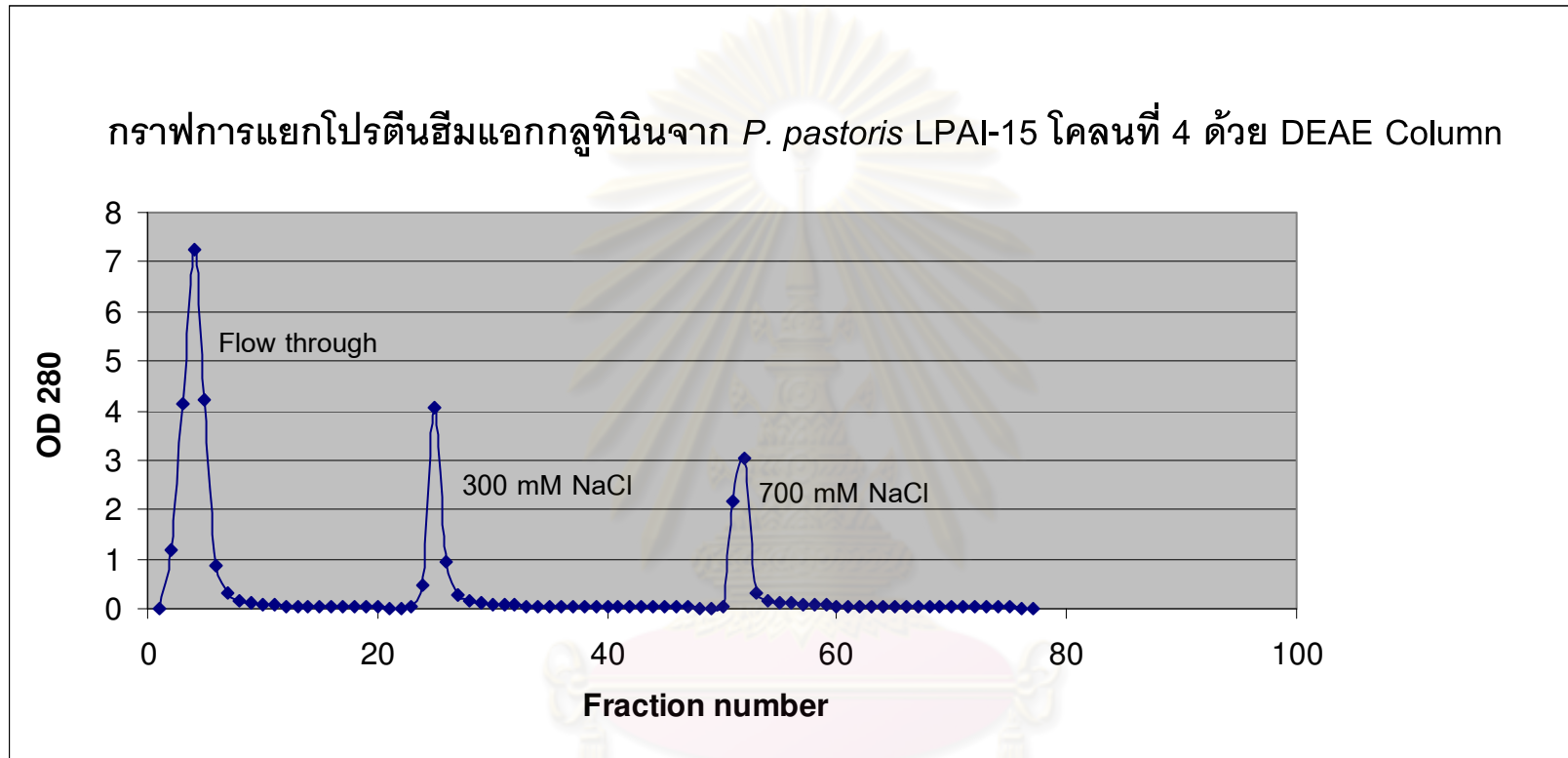
หลุมที่ P cell infected virus

หลุมที่ 1-2 โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มีเยื่อ Hemagglutinin สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column ส่วนของพีคที่ 1 และ 2

หลุมที่ N บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการละลายโปรตีน (20 mM Tris-HCl, pH 8.0)

ต่อมาทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ สายพันธุ์ LPAI-15 โคลนที่ 4 ด้วยการใช้อัลบั้ม Ion Exchange chromatography (DEAE Column) ผลการทดลองเป็นดังรูปที่ 4.33 จากกราฟจะเห็นได้ว่าเมื่อนำโปรตีนฮีมแอกกลูตินินจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ LPAI-15 โคลนที่ 4 มาทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่าน DEAE Column จะพบพีคของโปรตีนใน flow through, 300 mM NaCl และ 700 mM NaCl ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์โปรตีนในแต่ละ fraction โดยใช้ SDS-PAGE และ western blotting

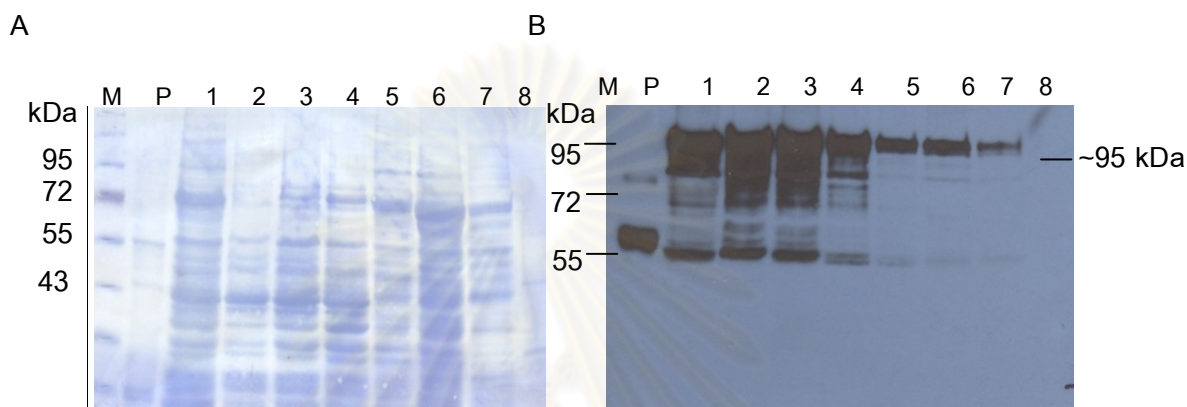
ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.33 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มีฮีมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ LPAI-15 โคลนที่ 4 โดยใช้ DEAE Column

ศูนย์วิจัยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

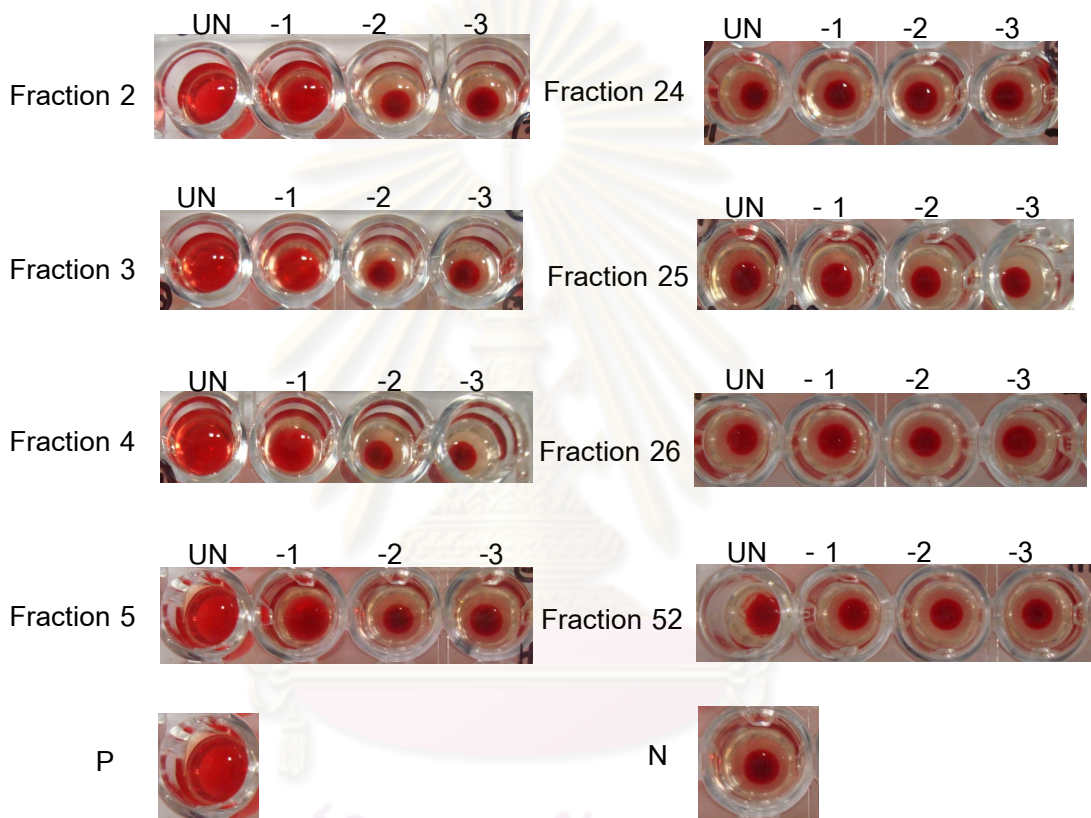
หลังจากนำ fraction ของ flow through, 300 mM NaCl และ 700 mM NaCl ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร มาทำการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE และ western blotting พบว่าพบแถบของโปรตีนใน fraction ของ flow through (fraction ที่ 2-5) และ 300 mM NaCl (fraction ที่ 24-26) แต่ไม่พบแถบโปรตีนใน fraction ของ 700 mM NaCl (fraction ที่ 52) ดังแสดงในรูปที่ 4.34



รูปที่ 4.34 SDS-PAGE (A) และ western blotting (B) ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ยีสต์สายพันธุ์ LPAl-15 โคลนที่ 4 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column

- |            |  |
|------------|--|
| เลนที่ M   | Protein Marker (Fermentas, U.S.A)  |
| เลนที่ P   | cell infected virus (62 กิโลดาลตัน)  |
| เลนที่ 1-4 | โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีโมแอกกลูทินินสายพันธุ์ LPAl-15 โคลนที่ 4 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column ส่วนของ Flow through (Fraction 2-5 ตามลำดับ)  |
| เลนที่ 5-7 | โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีโมแอกกลูทินินสายพันธุ์ LPAl-15 โคลนที่ 4 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column ส่วนของ 300 mM NaCl (Fraction 24-26 ตามลำดับ) |
| เลนที่ 8   | โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีโมแอกกลูทินินสายพันธุ์ LPAl-15 โคลนที่ 4 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column ส่วนของ 700 mM NaCl (Fraction 52)             |

หลังจากนั้นนำมาคัดเลือก โดยใช้คุณสมบัติของโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินในการเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดง (Hemagglutination) จากการทดลองพบว่าโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ LPAI-15 โคลนที่ 4 หลังจากทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่าน DEAE Column นั้นพบว่า fraction ส่วนของ flow through (Fraction 2-5) เท่านั้นที่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงได้ (รูปที่ 4.35) จึงนำ fraction ดังกล่าวมาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่งด้วย Sephacryl S-200 Column



รูปที่ 4.35 การเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย DEAE Column

หลุมที่ P cell infected virus

หลุมที่ N บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการละลายโปรตีน (20 mM Tris-HCl, pH 8.0)

โดยที่ UN = โปรตีนฮีมาแอกกลูตินินที่ไม่ได้เจือจาง

-1 = โปรตีนฮีมาแอกกลูตินินที่เจือจาง 10 เท่า

-2 = โปรตีนฮีมาแอกกลูตินินที่เจือจาง 100 เท่า

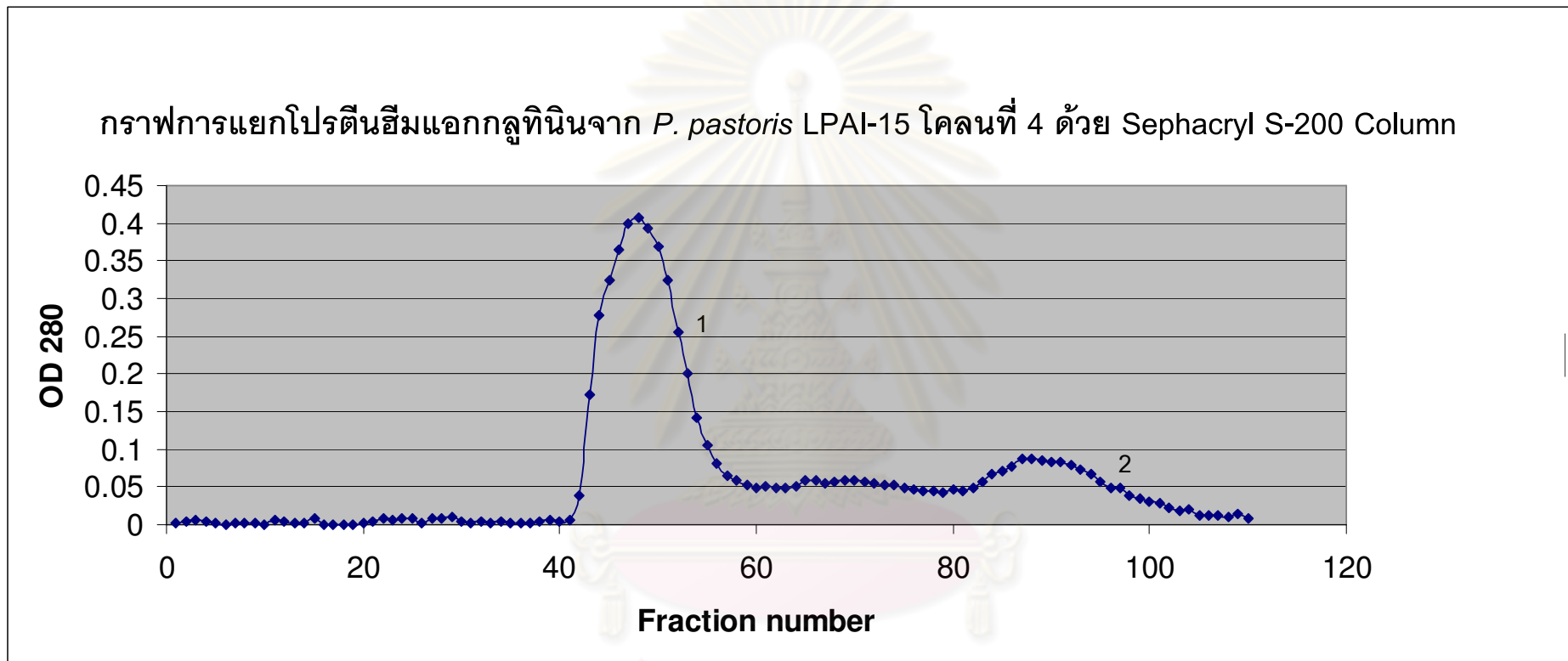
-3 = โปรตีนฮีมาแอกกลูตินินที่เจือจาง 1,000 เท่า

จากนั้นจึงนำโปรตีนในน้ำแต่ละ Fraction ของ Flow through มารวมกัน และทำให้เข้มข้น  
ด้วยการใช้ Milicon จากนั้นนำโปรตีนดังกล่าวมาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วย Sephacryl  
S-200 Column ซึ่งผลการทดลองพบ พีคของโปรตีนทั้งหมด 2 พีค (รูปที่ 4.36)



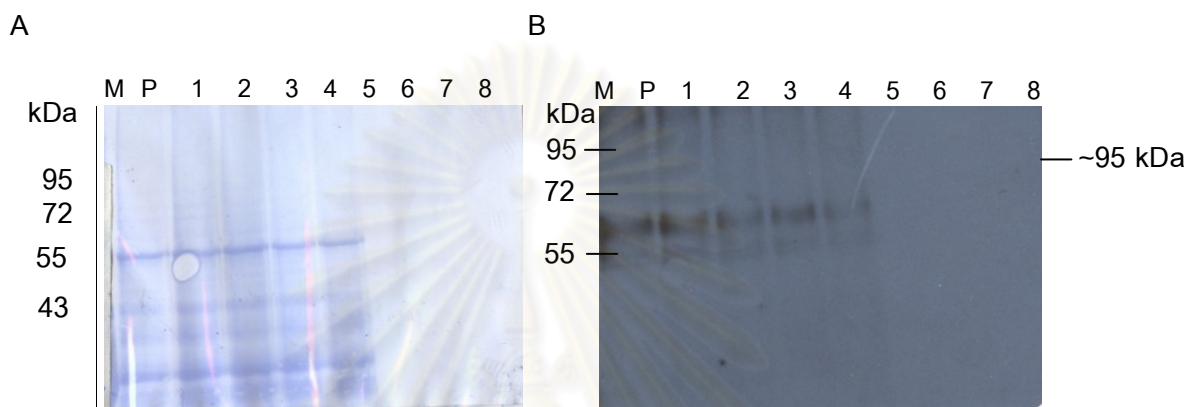
ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 4.36 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มีฮีมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ LPAL-15 โคลนที่ 4 โดยใช้ Sephacryl S-200 Column

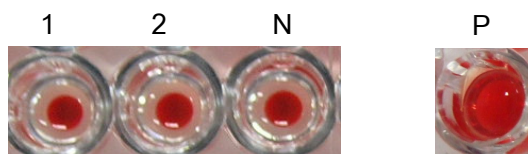
จากกราฟจะเห็นได้ว่าเมื่อนำโปรตีนฮีมแอกกลูตินินจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ LPAI-15 โคลนที่ 4 มาทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่าน DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column จะพบพีคของโปรตีน 2 พีค จึงทำการวิเคราะห์โปรตีนในแต่ละ fraction ของแต่ละพีคโดยใช้ SDS-PAGE และ western blotting จากผลการทดลอง พบแถบของโปรตีนใน fraction ของพีคที่ 1 และไม่พบแถบโปรตีนใน fraction ของพีคที่ 2 (รูปที่ 4.37)



รูปที่ 4.37 SDS-PAGE (A) และ western blotting (B) ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ยีสต์สายพันธุ์ LPAI-15 โคลนที่ 4 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column

- เลนที่ M Protein Marker (Fermentas, U.S.A)  
 เลนที่ P cell infected virus (62 กิโลดาลตัน)  
 เลนที่ 1-4 โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มีฮีมแอกกลูตินินสายพันธุ์ LPAI-15 โคลนที่ 4 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column ส่วนของพีค 1 (Fraction 46-49)  
 เลนที่ 5-8 โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มีฮีมแอกกลูตินินสายพันธุ์ LPAI-15 โคลนที่ 4 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column ส่วนของพีค 2 (Fraction 87-90)

จากนั้นนำ Fraction ของพีคแรกมารวมกัน และทำการ dialysis เพื่อขจัด urea ก่อนนำมาทดสอบความสามารถในการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ซึ่งผลการทดลองพบว่าโปรตีนดังกล่าวไม่ก่อให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้ (รูปที่ 4.38)



รูปที่ 4.38 การเกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column

หลุมที่ P cell infected virus

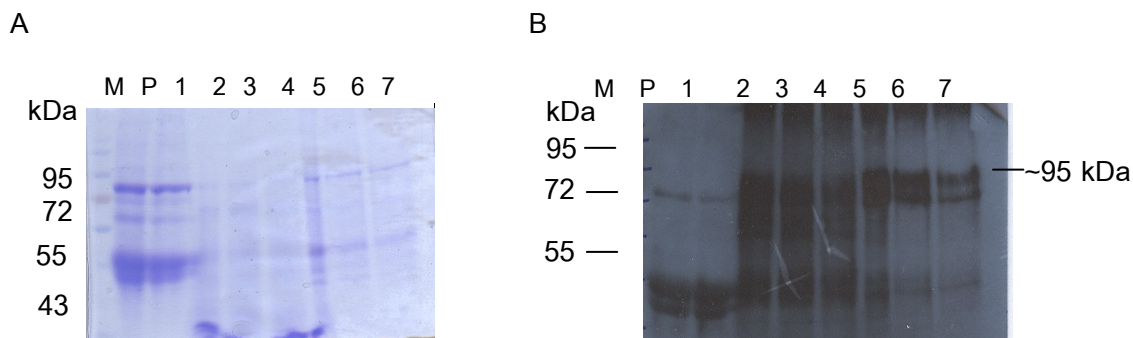
หลุมที่ 1-2 โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มีเยื่อ Hemagglutinin

สายพันธุ์ LPAI-15 โคลนที่ 4 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column ส่วนของพีคที่ 1 และ 2

หลุมที่ N บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการละลายโปรตีน (20 mM Tris-HCl, pH 8.0)

ส่วนอีกคุณสมบัติหนึ่งของโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินที่ทำการทดสอบ คือ การถูกตัดด้วยเอนไซม์ Furin เมื่อทำการทดลองใช้เอนไซม์ Furin ในการตัดโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินทั้ง 3 สายพันธุ์พบว่าโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินไม่สามารถถูกเอนไซม์ Furin ตัดได้ โดยเปรียบเทียบสัญญาณของแถบโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินหลังจากการทำให้บริสุทธิ์ด้วย DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column กับ โปรตีนดังกล่าวที่ถูกตัดและไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ Furin (รูปที่ 4.39 และ 4.40) พบว่ามีรูปแบบสัญญาณที่เหมือนกัน จึงสรุปว่าโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินที่ผลิตจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ไม่สามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ Furin ได้ ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินมีการเติมหมู่น้ำตาลมากเกินไป ทำให้เกิดการบดบังตำแหน่งตัดของเอนไซม์ Furin ส่งผลให้เอนไซม์ Furin ไม่สามารถตัดโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินได้

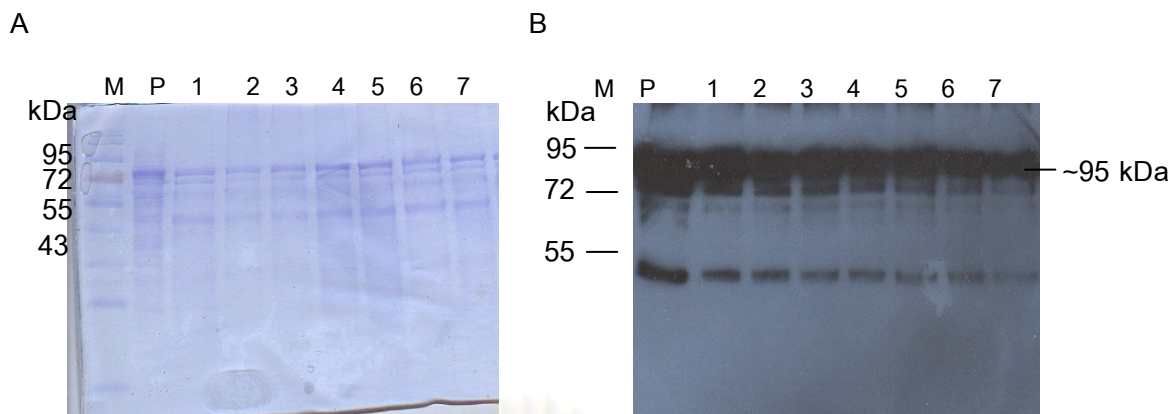
ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.39 SDS-PAGE (A) และ western blotting (B) ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่นำมาทดสอบการถูกตัดด้วยเอนไซม์ Furin หลังจากทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column

เลขที่ M	Protein Marker (Fermentas, U.S.A)
เลขที่ P	cell infected virus uncut (62 กิโลดาลตัน)
เลขที่ 1	cell infected virus cut (62 กิโลดาลตัน)
เลขที่ 2	โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ LPAI-15 โคลนที่ 4
เลขที่ 3	โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ LPAI-15 โคลนที่ 4 ที่ไม่ใส่เอนไซม์ Furin
เลขที่ 4	โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ LPAI-15 โคลนที่ 4 ที่ใส่เอนไซม์ Furin
เลขที่ 5	โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2
เลขที่ 6	โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 ที่ไม่ใส่เอนไซม์ Furin
เลขที่ 7	โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 ที่ใส่เอนไซม์ Furin

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.40 SDS-PAGE (A) และ western blotting (B) ของโปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่นำมาทดสอบการถูกตัดด้วยเอนไซม์ Furin หลังจากทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column

- |          |   |
|----------|---|
| เลนที่ M | Protein Marker (Fermentas, U.S.A)   |
| เลนที่ P | cell infected virus uncut (62 กิโลดาลตัน)   |
| เลนที่ 1 | cell infected virus cut (62 กิโลดาลตัน)   |
| เลนที่ 2 | โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38                        |
| เลนที่ 3 | โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 ที่ไม่ใส่เอนไซม์ Furin |
| เลนที่ 4 | โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 172-2006 โคลนที่ 38 ที่ใส่เอนไซม์ Furin    |
| เลนที่ 5 | โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2                         |
| เลนที่ 6 | โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 ที่ไม่ใส่เอนไซม์ Furin  |
| เลนที่ 7 | โปรตีนภายในเซลล์ของรีคอมบิแนนท์ <i>P. pastoris</i> ที่มียีนฮีโมแอกกลูตินิน สายพันธุ์ 168-2006 โคลนที่ 2 ที่ใส่เอนไซม์ Furin     |

## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

เชื้อไวรัสใช้หัตถ์นกมีความสามารถในการแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งพาหะที่สำคัญในการแพร่ระบาดของโรค คือ สัตว์ปีก โดยเฉพาะไก่และเป็ด ซึ่งเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สร้างรายได้ให้กับประเทศเป็นจำนวนมาก เมื่อเกิดการแพร่ระบาดสิ่งที่ทำได้ คือ การเฝ้าระวังไม่ให้เกิดการแพร่ระบาดกระจายออกไปสู่พื้นที่ใหม่ ๆ ดังนั้น การผลิตวัคซีน การพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัส รวมทั้งการพัฒนาวัคซีนไวรัสในการป้องกันการติดเชื้อ และ/หรือ การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส ย่อมส่งผลดีในการควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อ ซึ่งในอดีตจะใช้นุ้ภาคของไวรัสโดยตรงในการสร้าง โดยมีข้อเสีย คือ อันตรายและต้นทุนสูง

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการโคลนยีนฮีโมแอกกลูตินินจำนวน 3 สายพันธุ์ เข้าสู่พลาสมิด pPICZαA และทำการแสดงออกในเซลล์ *P. pastoris* โดยแยกเป็นสายพันธุ์ที่แพร่ระบาดรุนแรงจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ 168-2006 และ 172-2006 และสายพันธุ์ที่แพร่ระบาดต่ำจำนวน 1 สายพันธุ์ คือ LPAI-15 รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ถูกต้องนำมาทำให้เป็นเส้นตรงและแทรกเข้าสู่จีโนมของยีสต์ *P. pastoris* KM 71 จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์ยีสต์ที่ได้มาชักนำให้เกิดการแสดงออก และวิเคราะห์โปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE และทำการยืนยันผลโดยใช้ western blotting โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนฮีโมแอกกลูตินิน ซึ่งจากการทดลองพบโปรตีนฮีโมแอกกลูตินินถูกผลิตและเก็บไว้ในเซลล์ ดังนั้นจึงต้องทำการสกัดโปรตีนภายในเซลล์ออกมา ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับการแสดงออกของยีนฮีโมแอกกลูตินินจากไวรัสใช้หัตถ์นก สายพันธุ์ H5N2 ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ GS115 (Wang และคณะ, 2007) กล่าวคือโปรตีนฮีโมแอกกลูตินินถูกผลิต และเก็บไว้ในเซลล์ยีสต์ แต่ทว่ามีความแตกต่างในขั้นตอนการชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วยเมทานอล โดยใช้ความเข้มข้นของเมทานอลเพียง 0.5% (v/v) และใช้เวลา 4-5 วันในการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าว สำหรับงานวิจัยนี้ ได้ใช้ 3-4% (v/v) เมทานอล ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการชักนำ และสามารถพบการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวได้ตั้งแต่วันแรกของการชักนำ ซึ่งอาจบอกได้ว่าความเข้มข้นของเมทานอลที่ใช้ในการชักนำ และเซลล์เจ้าบ้านที่ใช้ในการแสดงออกมีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนฮีโมแอกกลูตินิน นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Hu และคณะ (2006) ได้ทำการโคลนยีนฮีโมแอกกลูตินินของไวรัสใช้หัตถ์นก สายพันธุ์ H5N2 แล้วทำการแสดงออกโดยใช้ baculovirus expression system และใช้ Sf-9 insect cells เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการแสดงออก พบว่า รีคอมบิแนนท์โปรตีนเป็นโปรตีนที่ผลิตและเก็บไว้ในเซลล์เช่นกัน

งานวิจัยของ Hu และคณะ (2006) ได้ศึกษาหา detergents ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด ในการสกัดโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินของไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N2 ใน baculovirus expression system พบว่าการใช้ 1% Triton X-100 หรือ 1% Tween 20 และบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำให้สามารถสกัดโปรตีนภายในเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมาก สำหรับงานวิจัยชิ้นนี้ได้ทำการสกัดโปรตีนออกจากเซลล์บางส่วน เพื่อนำมาศึกษาการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ western blotting ซึ่งดัดแปลงจากงานวิจัยดังกล่าวข้างต้น โดยลดปริมาณของ Tween 20 ลงครึ่งหนึ่ง กอปรกับนำมาต้มเป็นเวลา 5 นาที ทั้งนี้เนื่องมาจากผนังเซลล์ของยีสต์มีความแข็งแรงจากการทดลองพบว่า วิธีดังกล่าวสามารถสกัดโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ยีสต์มาทำการตรวจสอบเบื้องต้นได้

สำหรับงานวิจัยนี้ พบว่าโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินที่แสดงออกมีขนาดประมาณ 95 กิโลดาลตัน โดยความเป็นจริงแล้วโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินที่คาดไว้ควรมีขนาดประมาณ 62 กิโลดาลตัน การที่โปรตีนฮีมาแอกกลูตินินมีขนาดเพิ่มขึ้น อาจเกิดจากกระบวนการ post-translation modification ของเชื้อ *P. pastoris* อาทิเช่น การเติมหมู่น้ำตาล (Glycosylation) เป็นต้น (Cereghino และคณะ, 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยของ Saelens และคณะ (1999) พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนฮีมาแอกกลูตินินจากเชื้อไวรัสอินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H3N2 ที่นำมาแสดงออกใน *P. pastoris* สายพันธุ์ GS115 มีการเกิด N-linked glycosylation โดยพบว่ามี การเติม น้ำตาล mannose ประมาณ 8-10 โมเลกุล ส่งผลให้ขนาดของรีคอมบิแนนท์โปรตีนมีขนาดเพิ่มขึ้นจาก 65 กิโลดาลตันเป็น 75-78 กิโลดาลตัน

นอกจากนี้ยังพบแถบของสัญญาณของโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินทั้ง 3 สายพันธุ์ที่มีขนาดต่ำกว่า 95 กิโลดาลตัน เป็นจำนวนมาก ทั้งนี้อาจเกิดจากโปรตีนดังกล่าวถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอสภายในเซลล์ยีสต์ การพบแถบโปรตีนขนาดเล็กนี้ส่งผลต่อการทำให้การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์นั้นยากยิ่งขึ้น การเติม protease inhibitors ลงไป เช่น Pepstatin A หรือ Bestatin เป็นต้น เป็นวิธีแก้ปัญหานี้ โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส นอกจากนี้ การเปลี่ยนเซลล์เจ้าบ้านเป็นสายพันธุ์ที่ protease deficiency เช่น *P. pastoris* สายพันธุ์ SMD1163, SMD1165 และ SMD1168 เป็นต้น อาจช่วยในการแก้ปัญหาดังกล่าวได้ (Huang และคณะ, 2007)

สำหรับความเข้มข้นของเมทานอล และจำนวนวันที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีนฮีมาแอกกลูตินิน พบว่ารีคอมบิแนนท์ยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์หลังผ่านการชักนำให้เกิดการแสดงออกโดยใช้ 3-4%(v/v) เมทานอล และบ่มเป็นเวลา 2 วัน สามารถพบการแสดงออกของโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินได้จำนวนมากระดับหนึ่ง จึงเลือกสภาวะดังกล่าวมาใช้ในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าว และนำโปรตีนนั้นมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย เมื่อนำโปรตีนฮีมาแอกกลูตินินทั้ง 3 สายพันธุ์ มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย DEAE Column (Ion Exchange chromatography) พบว่า พีคของ

โปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ดังกล่าว มีรูปแบบที่เหมือนกัน กล่าวคือจะพบพีคของโปรตีนใน Flow through, 300 mM NaCl และ 700 mM NaCl เมื่อทำการวิเคราะห์การแสดงออกด้วยวิธี SDS-PAGE และ western blotting โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนฮีมแอกกลูตินินแล้ว พบสัญญาณแถบของโปรตีนฮีมแอกกลูตินินใน Flow through และ 300 mM NaCl เท่านั้น และจากการสังเกตสัญญาณแถบของโปรตีน จะเห็นได้ว่าสัญญาณแถบของโปรตีนขนาดเล็กมีปริมาณลดลง เมื่อเทียบกับสัญญาณแถบของโปรตีนขนาดเล็กของโปรตีนฮีมแอกกลูตินินทั้ง 3 สายพันธุ์ก่อนนำมาผ่าน DEAE column ดังนั้น การทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column อาจจะช่วยกำจัดโปรตีนขนาดเล็ก ๆ ออกไป ทำให้สัญญาณแถบของโปรตีนขนาดเล็กมีปริมาณลดลง ซึ่งคล้ายคลึงกับการทดลองของ Saelens และคณะ (1999) ได้ทำการโคลนยีนฮีมแอกกลูตินินของไวรัสฮินฟลูเอนซา สายพันธุ์ H3N2 โดยใช้ *P. pastoris* สายพันธุ์ GS115 เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการแสดงออก หลังจากชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย 2% (v/v) เมทานอล เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นนำส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Q-HyperD Column พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนฮีมแอกกลูตินินไม่จับกับตัวคอลัมน์ นั่นคือรีคอมบิแนนท์โปรตีนอยู่ใน Flow through จากการทดลองนี้การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ Q-HyperD Column เป็นการกำจัดโปรตีนชนิดอื่นออกไปบางส่วน เพื่อให้ง่ายต่อการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยขั้นตอนต่อไป

หลังจากนั้นนำโปรตีนฮีมแอกกลูตินินทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย DEAE Column ใน Flow through และ 300 mM NaCl มาทำการทดสอบโดยใช้ปฏิบัติการเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงเพื่อทำการคัดเลือก fraction ที่ให้ผลบวกมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel Filtration chromatography (Sephacryl S-200 Column) อีกครั้งหนึ่ง เมื่อทำการทดสอบปฏิบัติการเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดงแล้ว พบว่าโปรตีนฮีมแอกกลูตินินทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย DEAE Column ใน Flow through เท่านั้นที่ให้ผลบวก จึงนำโปรตีนฮีมแอกกลูตินินส่วนของ Flow through มารวมกัน เพื่อทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้ Sephacryl S-200 Column

โปรตีนฮีมแอกกลูตินินใน Flow through จาก 3 สายพันธุ์ที่นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Sephacryl S-200 Column พบพีคของโปรตีนทั้งหมด 2 พีค จึงนำมาวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE และ western blotting โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนฮีมแอกกลูตินิน จากผลการทดลองพบว่าพบสัญญาณแถบของโปรตีนฮีมแอกกลูตินินในพีคที่ 1 เท่านั้น จากผลการทดลองในงานวิจัยนี้ได้ทำโปรตีนฮีมแอกกลูตินินทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ โดยใช้ DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column

ต่อมาเมื่อนำโปรตีนฮีมแอกกลูตินินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE Column และ Sephacryl S-200 Column มาทำปฏิบัติการเกาะกลุ่มกับเม็ดเลือดแดง พบว่ามีผลเป็นลบ นั่นคือไม่สามารถก่อให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่โปรตีนฮีมแอกกลู



ทินินนั้นถูกทำให้เสียสภาพด้วยยูเรียในขั้นตอนก่อนทำให้บริสุทธิ์ด้วย Sephacryl S-200 Column และไม่สามารถเกิดการหมุนพับกลับมาได้รูปแบบเดิมหลังจากการทำ dialysis ซึ่งเมื่อนำไปศึกษาต่อในการถูกตัดด้วยเอนไซม์ Furin พบว่าไม่สามารถตัดได้เช่นเดียวกัน ทั้งนี้อาจเป็นเนื่องมาจากการตัดด้วยเอนไซม์ Furin อาจต้องอาศัยรูปแบบเดิมของโปรตีนฮีมแอกกลูทินิน ซึ่งมีความจำเพาะในการจดจำของ active site ของเอนไซม์ Furin นอกจากนี้ การที่เอนไซม์ Furin ไม่สามารถตัดโปรตีนฮีมแอกกลูทินินได้ อาจเกิดจากการเติมหมู่น้ำตาลมากเกินไปของรีคอมบิแนนท์โปรตีนฮีมแอกกลูทินิน ทำให้บดบังตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ Furin ส่งผลให้เอนไซม์ Furin ไม่สามารถตัดรีคอมบิแนนท์โปรตีนฮีมแอกกลูทินินได้

### ข้อเสนอแนะ

- ในการวิจัยครั้งนี้ได้ใช้เซลล์เจ้าบ้านของยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ KM71 ในการชักนำให้เกิดการแสดงออก ซึ่งพบว่าโปรตีนดังกล่าวถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสภายในเซลล์ การทดลองในอนาคต ปัญหาดังกล่าวอาจแก้ไขได้ด้วยการใช้ยีสต์ที่มีสายพันธุ์ Protease deficiency
- การศึกษาการถูกตัดด้วยเอนไซม์ Furin อาจนำเฉพาะโปรตีนฮีมแอกกลูทินินหลังจากการทำให้บริสุทธิ์ด้วย DEAE Column ที่อยู่ใน fraction ของ 300 mM NaCl มาทำการศึกษาทั้งนี้เนื่องมาจากโปรตีนดังกล่าวยังไม่ได้ถูกทำให้เสียสภาพ
- โปรตีนฮีมแอกกลูทินินที่แสดงออกได้นี้ สามารถที่ได้ไปใช้ศึกษาในงานวิจัยอื่น ๆ อาทิ เช่น การกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนู การพัฒนาชุดตรวจสอบไวรัส หรือ การค้นหายาต้านไวรัส เป็นต้น

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

ภาวพันธ์ ภัทรโกศล และคณะ. ไข้หวัดใหญ่/ไข้หวัดนก. กรุงเทพมหานคร : โนว์เลาต์ เพรส, 2549.

ศูนย์สารสนเทศการเกษตร. สถิติการค้าสินค้าเกษตรไทยกับต่างประเทศ ปี 2552. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2552.

### ภาษาอังกฤษ

Bender, C., et al. 1999. Characterization of the Surface Proteins of Influenza A (H5N1) Viruses Isolated from Humans in 1997-1998. Virology. 254 : 115-123.

Bergmann, M., et al. 2000. Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication. Journal of Virology. 74 : 6203-6206.

Biesova, Z., et al. 2009. Preparation characterization and immunogenicity in mice of a recombinant influenza H5 hemagglutinin vaccine against the avian H5N1 A/Vietnam/ 1203/ 2004 influenza virus. Vaccine. 27 : 6234-6238.

Bouvier, N. M., and Palese, P. 2008. The biology of influenza viruses. Vaccine. 26 : 49-53.

Cereghino, J. L., Cereghino, G. P, Ilgen, C., and Cregg, J. M. 2002. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. Current Opinion in Biotechnology. 13 : 329-332.

Cregg, J. M. Pichia Protocols. New Jersey. Humana Press Inc, 2007.

- Dulyachai, W., et al. 2010. Perinatal pandemic (H5N1) 2009 infection, Thailand. Emerging Infectious Diseases. 16 : 343-344.
- German, E., and Laver, G. Viral Membrane Proteins : Structure, Function, and Drug Design. New York. Kluwer Academic / Plenum Publishers. 2005.
- Hartner, F. S., and Glieder, A. 2006. Regulation of methanol utilization pathway genes in yeast. Microbial Cell Factories. 5 : 1-21.
- Hausmann, J., Kretzschmar, E., Garten, W., and Klenk, H. D. 1997. Biosynthesis, intracellular transport and enzymatic activity of an avian influenza A virus neuraminidase : role of unpaired cysteines and individual oligosaccharides. Journal of General Virology. 78 : 3233-3245.
- Hu, Y. C., et al. 2006. Dual expression of the HA protein of H5N2 avian influenza virus in a baculovirus system. Journal of Virological Methods. 135 : 43-48.
- Huang, J., et al. 2007. Purification of the N- and C- terminal subdomains of recombinant heavy chain fragment C of botulinum neurotoxin serotype C. Methods in Molecular Biology. 389 : 77-98.
- Huang, Q., Sivaramakrishna, R. P., Ludwig, K., Korte, T., Bottcher, C., and Herrmann, A. 2003. Early steps of the conformational change of influenza virus hemagglutinin to a fusion active state stability and energetics of the hemagglutinin. Biochimica et Biophysica Acta. 1614 : 3-13.
- Johansson, B. E., and Brett, I. C. 2007. Changing perspective on immunization against influenza. Vaccine. 25 : 3062-3065.
- Knipe, D. M. Fields Virology. Philadelphia. Lippinott Williams & Wilkins, 2001.

- Lee, M. S., Chang, P. C., Shien, J. H., Cheng, M. C., and Shieh, H. K. 2001. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. Journal of Virological Methods. 97 : 13-22.
- Li, P., et al. 2007. Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. Applied Biochemistry and Biotechnology. 142 : 105-124.
- Luo, G., et al. 1997. Molecular mechanism underlying the action of novel fusion inhibitor of influenza A virus. Journal of Virology. 71 : 4062-4070.
- Mayson, B. E., Kilburn, D. G., Zamost, B. L., Raymond, C. K., and Lesnicki, G. J. 2003. Effects of Methanol Concentration on Expression Levels of Recombinant Protein in Fed-Batch Cultures of *Pichia methanolica*. Biotechnology and Bioengineering. 81 : 291-298.
- Ohuchi, M., Asaoka, N., Sakai, T., and Ohuchi, R. 2006. Roles of neuraminidase in the initial stage of influenza virus infection. Microbes and Infection. 8 : 1287-1293.
- Puthavathana, P. 2005. Virology of H5N1 viruses. Siriraj Medical Journal. 57 : 283-290.
- Porro, D., Sauer, M., Branduardi, P., and Mattanovich, D. 2005. Recombinant Protein Production in Yeasts. Molecular Biotechnology. 31 : 245-259.
- Russell, R. J., et al. 2008. Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion. Proceeding of the National Academy of Science. 105 : 17736-17741.
- Saelens, X., et al. 1999. Protection of mice against a lethal influenza virus challenge after immunization with yeast-derived secreted influenza virus hemagglutinin. European Journal of Biochemistry. 260 : 166-175.

- Sastre, A. G., and Palese, P. 1995. The cytoplasmic tail of the neuraminidase protein of influenza A virus does not play an important role in the packaging of this protein into viral envelopes. Virus Research. 37 : 37-47.
- Skehel, J. J., and Wiley, D. C. 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry:the influenza hemagglutinin. Annual Review of Biochemistry. 69 : 531-569.
- Stevens, J., Blixt, O., Tumpey, T. M., Taubenberger, J. K., Paulson, J. C., and Wilson, I. A. 2006. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. Science. 312 : 404-410.
- Subbarao, K., and Joseph, T. 2007. Scientific barriers to developing vaccines against avian influenza viruses. Nature Reviews. 7: 267-278.
- Sunga, A. J., and Cregg, J. M. 2004. The *Pichia pastoris* formaldehyde dehydrogenase gene (*FLD1*) as a marker for selection of multicopy expression strains of *P. pastoris*. Gene. 330 : 39-47.
- Sylte, M. J., Hubby, B., Suarez, D. L. 2007. Influenza neuraminidase antibodies provide partial protection for chickens against high pathogenic avian influenza infection. Vaccine. 25 : 3763-3772.
- Taubenberger, J. K., Reid, A. H., Janczewski, T. H., and Fanning, T. G. 2001. Characterization of the 1918 influenza virus hemagglutinin and neuraminidase genes. International Congress Series. 1219 : 545-549.
- Tienson, T., et al. 2005. Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1, Thailand, 2004. Emerging Infectious Diseases. 11 : 1664-1672.

Wagner, R., Feldmann, A., Wolff, T., Pleschka, S., Garten, W., and Klenk, H. D. 2001. Hemagglutinin and neuraminidase as determinants of influenza virus pathogenicity. International Congress Series. 1219 : 533-543.

Wang, C. Y., et al. 2007. The cleavage of the hemagglutinin protein of H5N2 avian influenza virus in yeast. Journal of Virological Methods. 146 : 293-297.

White, D. O., and Fenner, F. J. Medical Virology. Academic Press. San Diego, 1994.

Witoonsatien, K., Rukkwamsuk, T., Songserm, T., and Sirinarumitr, T. 2007. Cloning and expression of HA gene from a Highly Pathogenic Avian Influenza (H5N1) isolate in Thailand. Kasertsart Journal. 41 : 502-513.



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ภาคผนวก ก**  
**สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ**

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth)

ทริปโตเนน (tryptone)	10	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม

สารละลายสารทั้งสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล เป็น 7.2 จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB และละลายวุ้น 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตรเพิ่มลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar) ที่มีสารปฏิชีวนะซีโอซิน

เตรียมอาหารเช่นเดียวกับข้อ 2 หลังจากนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอแล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เติมสารปฏิชีวนะซีโอซิน (zeocin) ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD

ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	10	กรัม
เพปโตเนน (tryptone)	10	กรัม
กลูโคส (glucose)	20	กรัม



สารละลายสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

#### 5. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD

เตรียมอาหารด้วยวิธีเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD และละลายยูน 15 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตรเพิ่มลงไป จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

#### 6. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD ที่มีสารปฏิชีวนะซีโอซิน

เตรียมอาหารเช่นเดียวกับข้อ 4 หลังจากนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำแล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เติมสารปฏิชีวนะซีโอซิน (zeocin) ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

#### 7. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BMGY

1% (w/v) ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)

2% (w/v) เพปโตเน (tryptone)

100 mM potassium phosphate, pH 6.0

1.34% (w/v) YNB

$4 \times 10^{-5}$  % (w/v) biotin

1% (v/v) glycerol

เตรียมส่วนผสมทั้งหมดและทำการฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ยกเว้น YNB และ biotin ให้ใช้การกรองด้วยหัวกรองขนาด  $0.2 \mu\text{m}$  จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดมาผสมกันในขวดที่ฆ่าเชื้อแล้ว

## 8. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BMMY

1% (w/v) ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)

2% (w/v) เพปโตเน (tryptone)

100 mM potassium phosphate, pH 6.0

1.34% (w/v) YNB

$4 \times 10^{-5}$  % (w/v) biotin

0.5% (v/v) methanol

เตรียมส่วนผสมทั้งหมดและทำการฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ยกเว้น YNB, biotin และ เมทานอล ให้ใช้การกรองด้วยหัวกรองขนาด 0.2  $\mu\text{m}$  จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดมาผสมกันในขวดที่ฆ่าเชื้อแล้ว



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ข

### สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

#### 1. กลีเซอรอล 80%

นำกลีเซอรอล 87% ปริมาตร 92 มิลลิลิตร ผสมน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 8 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำอีกรอบ

#### 2. สารละลายโซเดียมอะซีเตต เข้มข้น 3 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 5.2

โซเดียมอะซีเตต น้ำหนัก 204 กรัม ในน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรประมาณ 400 มิลลิลิตร นำไปปรับค่าความเป็นกรดเบสให้เป็น 5.2 ด้วยกรดอะซิติกปริมาตรประมาณ 57 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

#### 3. สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ความเป็นกรดเบส 8.0

ผสมสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 8.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

#### 4. สารละลายผสม dNTPs ที่มีความเข้มข้นของแต่ละนิวคลีโอไทด์ 10 มิลลิโมลาร์

ผสม dATP, dGTP, dCTP, dTTP ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ด้วยปริมาตรชนิดละ 10 ไมโครลิตร เข้ากันแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

## 5. บัฟเฟอร์ 50X Tris-acetate (TAE)

Trisma base	121	กรัม
กรดอะซิติกเข้มข้น	28.55	มิลลิลิตร
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์	50	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 300 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

## 6. 6X Loading dye

Bromphenolblue	0.25	%
Glycerol	40	%

ละลายส่วนผสมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

## 7. ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจล Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit

ประกอบด้วย

Buffer DF

Buffer W1

DF column

Wash Buffer

ก่อนใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอให้เติม absolute ethanol ปริมาตร 24 มิลลิลิตร ลงใน Wash Buffer โดยสกัดดีเอ็นเอตามกรรมวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

## 8. ชุดสกัดพลาสมิดปริมาณน้อย High-Speed Plasmid Mini kit

## ประกอบด้วย

Buffer PD1

Buffer PD2

Buffer PD3

Buffer W1

Wash Buffer

RNase A

PD column

ก่อนใช้ชุดสกัดพลาสมิดครั้งแรกให้เติม RNase A ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน Buffer PD1 และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C และเติม absolute ethanol ปริมาตร 24 มิลลิลิตร ลงใน Wash Buffer

## 9. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.5 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 8.8

Tris base ( $C_4H_{11}NO_3$ )	181.71 กรัม
-------------------------------	-------------

ละลาย Tris base ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยไฮโดรคลอริกเข้มข้น โดยค่อยๆ เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นคนให้เข้ากัน และวัดค่าความเป็นกรดเบส ให้เท่ากับ 8.8 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

## 10. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 6.8

Tris base ( $C_4H_{11}NO_3$ )	60.57 กรัม
-------------------------------	------------

ละลาย Tris base ในน้ำปลอดประจุปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยไฮโดรคลอริกเข้มข้น โดยค่อยๆ เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นคนให้เข้ากัน และวัดค่าความเป็นกรดเบส ให้เท่ากับ 6.8 เติมน้ำปลอดประจุจนเป็นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

## 11. สารละลาย 10% SDS

ชั่ง sodium dodecyl sulfate น้ำหนัก 10 กรัม ค่อยๆ ละลายในน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 80 มล. เมื่อละลายหมดเติมน้ำปลอดประจุให้ครบปริมาตร 100 มล.

## 12. สารละลาย 10% แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate)

ชั่งแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต 100 มิลลิกรัมใส่ในหลอดไมโครพิวซ์ที่ปราศจากเชื้อ เติมน้ำปลอดประจุหลอดเชื้อลงไป 1 มล. ละลายจนหมด

## 13. 4X Sample buffer

กลีเซอรอล (87%)	2.29	มล.
สารละลาย Tris-HCl ความเป็นกรดเบส 6.8	1	มล.
น้ำปลอดประจุหลอดเชื้อ	2.71	มล.
Bromphenolblue	0.001	กรัม
10% SDS	4	มล.

ผสมสารทุกชนิดเข้าด้วยกันและนำไปเก็บรักษาไว้ที่ อุณหภูมิ 4 °C ก่อนนำมาใช้ให้ผสม 2-mercaptoethanol ในอัตราส่วน สารละลาย 950 ไมโครลิตรต่อ 50 ไมโครลิตร 2-mercaptoethanol

## 14. 10X SDS running buffer

Tris base ( $C_4H_{11}NO_3$ )	30	กรัม
ไกลซีน (Glycine)	145	กรัม
SDS	10	กรัม

แยกสารละลายทั้งสามชนิดด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำมารวมกันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ก่อนใช้นำมาเจือจางด้วยน้ำปลอดประจุให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1X

## 15 TEG Buffer

50 mM Tris-HCL pH 7.5

10 mM EDTA

5 mM EGTA

25 mM NaCl

0.05% (v/v) Tween 20

10 % (v/v) glycerol

ผสมสารทุกอย่างให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรตามปริมาตรที่ต้องการ

## 16 Sample Breaking solution

ผสมสารตามข้อ 15 แต่เพิ่ม 200 ไมโครลิตร ของ 10 % SDS และ 1 mM DTT

## 17. Staining solution

Comassie brilliant blue R250	2	กรัม
เอทานอล	450	มิลลิลิตร
กรดอะซิติก	100	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสามชนิดเข้าด้วยกันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 18. Destaining solution

เอทานอล	400	มิลลิลิตร
กรดอะซิติก	100	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งสองชนิดเข้าด้วยกันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 19. fixing solution

เมทานอล	10%
กรดอะซิติก	10%
กลีเซอรอล	5%

ผสมสารทั้งสองชนิดเข้าด้วยกันและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 20. Transfer Buffer

Tris base ( $C_4H_{11}NO_3$ )	5.08 g
ไกลซีน	2.9 g
SDS	0.37 g

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 800 มิลลิลิตร ก่อนใช้เติมเมทานอล 200 มิลลิลิตร

## 21. Blocking solution

PBST	100 มิลลิลิตร
skim milk	5%

## 22. 1x PBS

NaCl	8	กรัม
KCl	0.2	กรัม
$Na_2HPO_4$	1.44	กรัม
$KH_2PO_4$	0.24	กรัม



ผสมสารทุกชนิดเข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่น 800 มล. ปรับ pH ให้เป็น 7.4 จากนั้น  
ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว  
อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

### 23. PBST

1X PBS	500 มิลลิลิตร
Tween20	0.05%

### 24. สับสเตรทสำหรับ HRP

#### Solution A

100 mM Tris-HCl pH 8.5	2.5 มิลลิลิตร
90 mM coumaric acid	11 ไมโครลิตร
250 mM luminal	25 ไมโครลิตร

#### Solution B

100 mM Tris-HCl pH 8.5	2.5 มิลลิลิตร
30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.5 ไมโครลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล	นายรพี สิ้นเนืองนอง
วัน/เดือน/ปีเกิด	28 มีนาคม 2528
สถานที่เกิด	จังหวัดชลบุรี
ประวัติการศึกษา	<p>พ.ศ. 2546-พ.ศ. 2549            ปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.)            สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์            มหาวิทยาลัยบูรพา</p> <p>พ.ศ. 2550-พ.ศ. 2553            ปริญญาโทวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วท.ม.)            สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม            คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย</p>
การนำเสนอผลงานทางวิชาการ	<p>พ.ศ. 2553 นำเสนอผลงานรูปแบบโปสเตอร์ ในหัวข้อ            “Expression and Characterization of            Hemagglutinin from Avian Flu (H5N1)            virus in <i>Pichia pastoris</i>” งานประชุมวิชาการ            TSB 2010 : International Conference on            Biotechnology for Healthy Living เมื่อวันที่            20-22 ตุลาคม 2553 ณ มหาวิทยาลัย            สงขลานครินทร์ วิทยาเขตตรัง จังหวัดตรัง</p>