โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การแสดงออกและการทำให้บริสุทธิ์ของโปรตีนหนามของ SARS-CoV-2 เพื่อการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัย COVID-19

ชื่อนิสิต นายศุภเสกข์ คาดการณ์ไกล รหัสประจำตัว 6032352923

ภาควิชา จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การแสดงออกและการทำให้บริสุทธิ์ของโปรตีนหนามของ SARS-CoV-2 เพื่อการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัย COVID-19

Expression and purification of spike protein of SARS-CoV-2 for diagnostic test development

ชื่อนิสิต นายศุภเสกข์ คาดการณ์ไกล **เลขประจำตัว** 6032352923

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงงาน	การแสดงออกและการทำให้บริสุทธิ์ของโปรตีนหนามของ SARS-CoV-2 เพื่อการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัย COVID-19
โดย	นายศุภเสกข์ คาดการณ์ไกล เลขประจำตัวนิสิต 6032352923
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ
ปีการศึกษา	2563

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงงานวิทยาศาสตร์

..... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา

(ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

..... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน

(ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัศวลาภสกุล)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร. ศิตา วีรกุล)

รายงานโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์

ชื่อโครงการ

การแสดงออกและการทำให้บริสุทธิ์ของโปรตีนหนามของ SARS-CoV-2
เพื่อการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัย COVID-19
(Expression and purification of spike protein of SARS-CoV-2
for diagnostic test development)

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ

นิสิตในโครงการ

นายศุภเสกข์ คาดการณ์ไกล
รหัสประจำตัวนิสิต 6032352923

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต

ประจำปีการศึกษา 2563

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงงาน	การแสดงออกและการทำให้บริสุทธิ์ของโปรตีนหนามของ SARS-CoV-2 เพื่อการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัย COVID-19
นิสิตเสนอโครงการ	นายศุภเสกข์ คาดการณ์ไกล เลขประจำตัวนิสิต 6032352923
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ	ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ
ภาควิชา	จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2563

บทคัดย่อ

โรคโควิด-19 เป็นโรคติดต่อทางระบบทางเดินหายใจที่เกิดจากเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์กลุ่มโรคทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรง (SARS-CoV-2 : Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) ไวรัส SARS-CoV-2 ติดเชื้อบริเวณทางเดินหายใจส่วนล่างของมนุษย์โดยอาศัยการจับกันของโปรตีนหนาม (Spike) ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อย S1 และ S2 โดย S1 โครงสร้างที่สำคัญที่มี RBD (Receptor binding domain) ซึ่งมีความจำเพาะในการจับกับ Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor ของมนุษย์เพื่อเข้าสู่เซลล์ สามารถติดต่อผ่านการสัมผัสกับผู้ติดเชื้อ ผ่านละอองเสมหะจากการไอ จาม น้ำมูก น้ำลาย ทำให้มีการแพร่ระบาดเป็นวงกว้างจนองค์การอนามัยโลกประกาศให้เป็นการระบาดระดับ “Pandemic” เนื่องด้วย COVID-19 เป็นโรคอุบัติใหม่การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัย พัฒนาวัคซีนมีความจำเป็นในการควบคุมการระบาด แต่การจะใช้ไวรัสเชื้อเป็น (live virus) ต้องอาศัยห้องปฏิบัติการที่มีระบบความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ3 (biosafety level III) ดังนั้น การใช้โปรตีนโครงสร้างของไวรัส SARS-CoV-2 จะเป็นหนึ่งในทางเลือกทำให้การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยและวัคซีนสามารถดำเนินไปได้สะดวกรวดเร็วยิ่งขึ้น ในงานวิจัยนี้จึงศึกษาการแสดงออกของโปรตีนหนามโดยอาศัยพลาสมิด 4 ชนิด ได้แก่ pCI neo stabilized spike, pCI neo RBD, pCMV S1, pCMV RBD ซึ่งถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน 2 ชนิด คือ Spike และ RBD มีขนาดประมาณ 200 และ 27 kDa (kilodalton) ตามลำดับ โดยนำพลาสมิดเข้าสู่ cell line 2 ชนิด ได้แก่ CHO-K1 และ HEK293 ซึ่งนำเข้าเซลล์แบบชั่วคราวโดยใช้ Fugene HD เพื่อทดสอบความสามารถในการแสดงออกโปรตีนแต่ละตัว พบว่ามีเพียง HEK293 ที่สามารถแสดงออกโปรตีนจากพลาสมิด pCI neo stabilized spike และpCI neo RBD จึงทำการคัดเลือกเซลล์ HEK293 ที่มีพลาสมิดโดยใช้ยา G418 (Geneticin) จากนั้นนำโปรตีนไปทำให้บริสุทธิ์ (purification) โดยวิธี affinity chromatography และตรวจสอบด้วย SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) และ Western blot ซึ่งใช้ α His tag rabbit mAb เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ ซึ่งการศึกษาเพิ่มเติมด้วยการทำELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) โดยทำการทดลองกับเลือดผู้ป่วยที่หายจากโรคจะสามารถตรวจสอบความสารถในการจับกับ antibody และนำไปสู่การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัย COVID-19 ต่อไป

Project title	Expression and purification of spike protein of SARS-CoV-2 for diagnostic test development
Name of student	Supasek Kadkanklai ID No. 6032352923
Advisor	Prof. Tanapat Palaga
Department	Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Abstract

COVID-19 is a severe acute respiratory syndrome caused by coronavirus (SARS-CoV-2), COVID-19 can be spread through contact with infected people, droplet from coughing, sneezing, mucus, saliva causing an epidermic occurring worldwide call “Pandemic” because this virus infects host cells using specific interaction between Receptor binding domain (RBD) within the S1 domain of Coronavirus Spike protein and Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor on host cell. Due to COVID-19 is a serious emerging disease, the development of diagnostic kits and vaccine is essential to control the outbreak, viral Neutralizing test use live virus and it needs to be performed in biosafety level III. Therefore, using recombinant structural protein of SARS-CoV-2 will offer alternative testing method. In this research, the expression of S protein by using four plasmids was studied. Those plasmids are pCI neo stabilized spike, pCI neo RBD, pCMV S1, pCMV RBD, the Spike and RBD protein have putative molecular weight are 200 and 27 kilodalton respectively. We transfect all into CHO-K1, HEK293 by using Fugene HD, Calcium-phosphate in transient transfection method and found that only HEK293 could express those protein from those plasmids pCI neo vector. In addition, we select transfected HEK293 by using G418 (Geneticin) and then harvest culture supernatant for purification by using affinity chromatography. The purified protein was confirm by SDS-PAGE and Western blot that using α His tag rabbit pAb as primary antibody. Further study using serum of COVID-19 convalescent patient or vaccinated people with ELISA can test binding activity of our recombinant protein lead to the diagnostic test development.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จไปด้วยดีเนื่องจากความกรุณาของ ศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา ข้อแนะนำต่างๆ ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างสูง รวมถึงคำสั่งสอนและคำแนะนำในการนำเสนอและวิธีการการถามตอบคำถาม และยังช่วยปรับปรุงแก้ไขโครงการวิจัยมาตลอดจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งและกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดความรู้ คำแนะนำ และให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์ต่อโครงการและตัวผู้วิจัย

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณทุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ จากงบประมาณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอกราบขอบพระคุณพี่ๆนักวิจัยประจำห้องวิจัย 2015 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่สอน ตักเตือน ให้ความรู้และคำแนะนำเกี่ยวกับเทคนิคเบื้องต้นในการปฏิบัติงาน การให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ รวมถึงการให้คำปรึกษาและข้อคิดต่างๆ ตั้งแต่เริ่มดำเนินการวิจัยจนเสร็จสิ้น

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัว เพื่อนๆ รุ่นพี่และรุ่นน้องที่คอยเป็นกำลังใจและแรงผลักดัน รวมถึงให้การสนับสนุนแก่ผู้วิจัยเสมอมาตลอดจนสิ้นสุดโครงการ

ศุภเสกข์ คาดการณ์ไกล

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทนำ	1
วัตถุประสงค์โครงการ	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
อุปกรณ์ที่ใช้และเคมีภัณฑ์	7
วิธีดำเนินการทดลอง	12
ผลการทดลอง	19
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	30
ภาคผนวก	33
เอกสารอ้างอิง	36

บทที่ 1

บทนำ

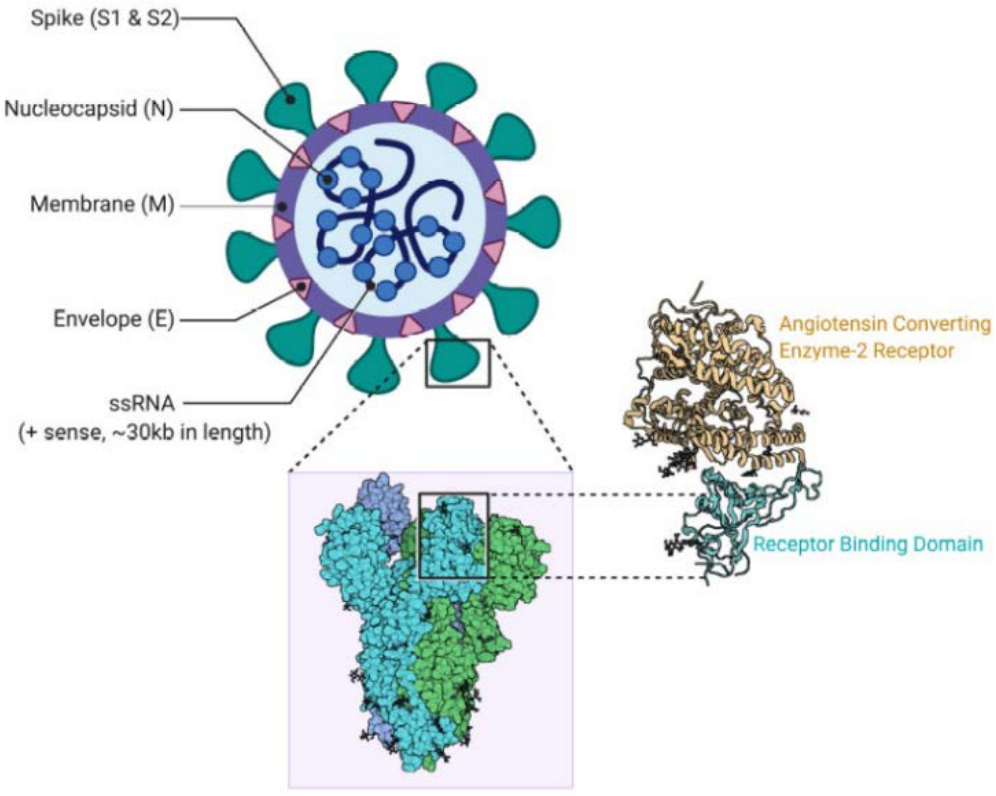
อุบัติการณ์ และการตรวจวินิจฉัยโรคของโรคโควิด-19

โรคโควิด-19 (COVID-19) เป็นโรคติดต่อที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสโคโรนาสายพันธุ์กลุ่มโรคทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรง (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 ; SARS-CoV-2) เริ่มระบาดในเมืองอู่ฮั่น มณฑลหูเป่ย ประเทศจีน ในปลายเดือนธันวาคม ปีค.ศ.2019และระบาด จนถึงปัจจุบัน ซึ่งเป็นสายพันธุ์ใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อนในมนุษย์ ไวรัส SARS-CoV-2 ติดเชื้อบริเวณทางเดินหายใจส่วนล่างของมนุษย์ โดยอาศัยการจับกันของโปรตีนหนาม (Spike) กับ Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor ของมนุษย์ สามารถติดต่อผ่านการสัมผัสกับผู้ติดเชื้อ ผ่านละอองเสมหะจากการไอ จาม น้ำมูก น้ำลาย ทำให้มีการแพร่ระบาดเป็นวงกว้างจนองค์การอนามัยโลกประกาศให้เป็นการระบาดระดับ “Pandemic” แพร่ระบาดไปทั่วโลก (3,12) เนื่องด้วย COVID-19 เป็นโรคอุบัติใหม่ ทำให้การพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคมีความจำเป็นในการควบคุมการระบาด วิธีมาตรฐานที่ใช้ตรวจโควิด-19ในห้องปฏิบัติการคือ Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) ซึ่งเป็นวิธีกระบวนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมายแบบจำเพาะ โดยอาศัยเครื่อง real time PCR thermal วิธีดังกล่าวมีข้อดีคือมีความจำเพาะสูง ส่วนข้อเสียคือใช้เวลานานต้องอาศัยเครื่องมือและความชำนาญในการใช้งาน การพัฒนาชุดตรวจชนิดอื่นๆ จะสามารถควบคุมการระบาดของโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็วกว่า (21) นอกจากการตรวจวินิจฉัยเพื่อการควบคุมโรคแล้วการตรวจวินิจฉัยเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนที่กำลังพัฒนาไม่ว่าจะเป็น inactivated vaccine, subunit vaccine, RNA-based vaccine, viral vectored vaccines หรือวิธีการรักษาด้วย monoclonal neutralizing antibodies, fusion inhibitors ก็มีความสำคัญเช่นกัน จะมีส่วนช่วยประกอบการตัดสินใจให้ผู้ต้องการรับวัคซีน มั่นใจในประสิทธิภาพ และเป็นที่ยอมรับมากขึ้นขึ้นไป (14)

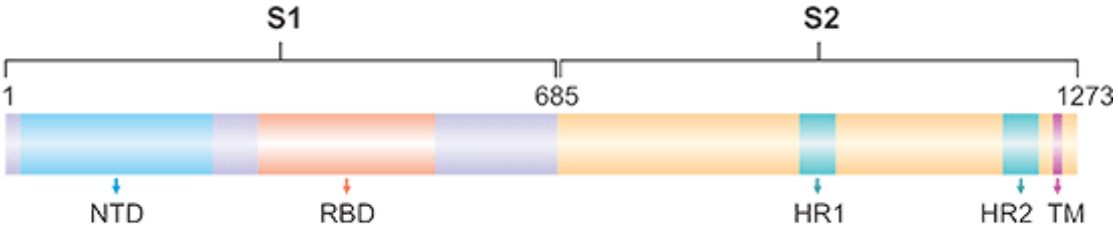
โครงสร้างของไวรัส SARS-CoV-2และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน

ไวรัส SARS-CoV-2 เป็นไวรัสในกลุ่ม Coronavirus โครงสร้างไวรัสในกลุ่มนี้จะมีองค์ประกอบพื้นฐาน ได้แก่ Spike glycoprotein (S), Nucleocapsid (N), Membrane protein (M), Envelope (E) ,และ Viral genome (ภาพที่ 1.1) โดยองค์ประกอบที่มีบทบาทสำคัญคือ Spike glycoprotein ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 1273 ตัว โดยจะเป็นโครงสร้างที่มีลักษณะเป็น homotrimer ยื่นออกมาจากผิวไวรัส ถูกแบ่งเป็น 2 ส่วนย่อยคือ S1 และ S2 โดยมี “furin cleavage site” เชื่อมทั้งสองอยู่ (17) ใน S1 จะมีโครงสร้างที่เรียกว่า Receptor Binding Domain (RBD) (ภาพที่ 1.2) ซึ่งจับกับ Angiotensin Converting Enzyme2 (ACE2) ที่เป็นตัวรับในมนุษย์ จากนั้น TMPRSS2 ของมนุษย์จะหลั่งเอนไซม์ “furin protease” เพื่อตัดบริเวณ furin cleavage site ทำให้ S1 และ S2 แยกจากกัน โดยที่ S2 จะเกิดการ fusion รวมกับ membrane ของเจ้าบ้าน และเข้าสู่เซลล์ในที่สุด (17)

เมื่อไวรัส SARS-CoV-2 เข้าไปในเซลล์มนุษย์ได้แล้ว เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดจะเข้ามาทำหน้าที่กำจัดไวรัส และมีการส่งสัญญาณให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเข้ามาทำงานต่อ เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะสามารถรับรู้โครงสร้างต่างๆของไวรัสได้ แต่จะมีระดับการตอบสนองที่ต่างกัน จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ผลสรุปว่า Spike protein เป็นโครงสร้างที่ระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์สามารถตอบสนองได้ดีที่สุด (8) การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะที่มีบทบาทมากที่สุดในการกำจัดเชื้อไวรัสคือการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสนั้น โดยแอนติบอดีที่สามารถยับยั้งเชื้อไวรัสได้จะถูกเรียกว่า “neutralizing antibody” ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่ถูกกระตุ้นได้จากการติดเชื้อตามธรรมชาติและการได้รับวัคซีน เมื่อเวลาผ่านไปไวรัส SARS-CoV-2 ย่อมเกิดการกลายพันธุ์ (ภาพที่ 1.3) โดยบริเวณที่พบการกลายพันธุ์มากที่สุดคือ Spike ยกตัวอย่างกลายพันธุ์ เช่น Spike mutation D614G คือกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 614 ของ Spike มีการเปลี่ยนกรดอะมิโนจาก Aspatic ไปเป็น Glycine ซึ่งการเปลี่ยนแปลงไปของโปรตีนโครงสร้างของไวรัสนี้จะส่งผลต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อไวรัสของ neutralizing antibody เพราะจะมี neutralizing antibody บางส่วนที่สามารถเกิด cross reactivity กับ Spike ที่เกิดการกลายพันธุ์ได้ ทำให้การพัฒนาวิธีรักษา การพัฒนาวัคซีน ต้องศึกษาควบคู่ไปกับการกลายพันธุ์เหล่านี้ด้วย (9)

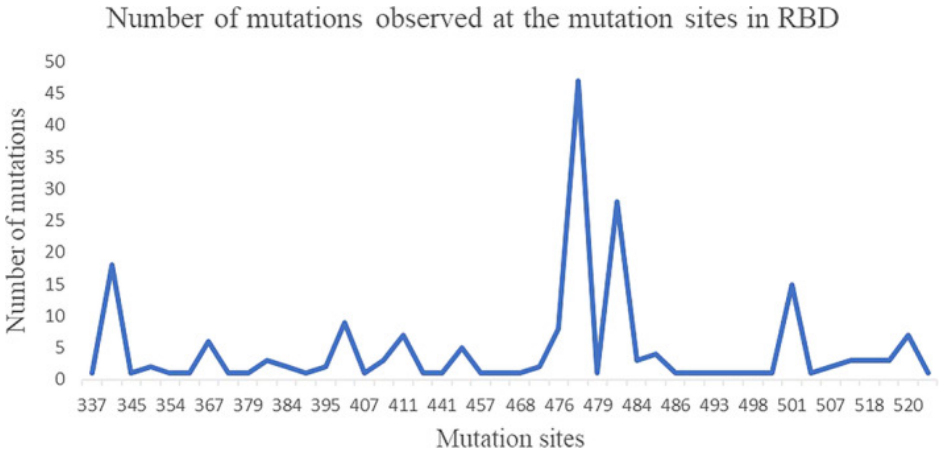


ภาพที่ 1.1 โครงสร้างของ SARS-CoV-2 (อ้างอิงจาก Rohan Bir Singh, MD; Made with Biorender.com)



ภาพที่ 1.2 แผนผังโครงสร้างของ SARS-CoV-2 spike protein

(อ้างอิงจาก Banerjee. Mutation hot spots in Spike protein of COVID-19. 2020)



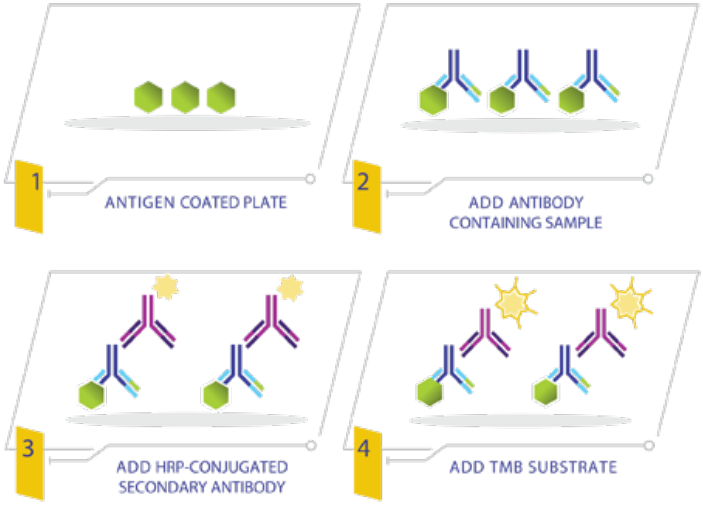
ภาพที่ 1.3 กราฟแสดงการเกิดการกลาบพันธุ์บริเวณ SARS-CoV-2 Receptor binding domain (อ้างอิงจาก Guruprasad. Proteins. 2021)

การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ (Protein purification) คือวิธีการแยกโปรตีนที่เราต้องการออกจากโปรตีนตัวอื่นโดยอาศัยคุณสมบัติทางกายภาพ และคุณสมบัติทางเคมีของโปรตีนแต่ละชนิดที่มีความแตกต่างกันในการแยก รวมทั้งแยกสิ่งปนเปื้อนต่างๆให้เหลือเพียงโปรตีนที่เราต้องการเพียงอย่างเดียว (5) ซึ่งวิธีในการทำให้บริสุทธิ์มีหลากหลายวิธีและมีหลักการต่างกันออกไปโดยวิธีที่ได้รับความนิยม เช่น affinity chromatography เป็นวิธีที่อาศัยการจับกันอย่างจำเพาะของโมเลกุลเพื่อคัดแยกโมเลกุลที่ต้องการออกจากโมเลกุลอื่นๆ เป็นต้น ขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์ แบ่งเป็น 3 ขั้นตอนย่อยดังนี้ เริ่มต้นจากการสกัดโปรตีน (Extraction) เป็นขั้นตอนการแยกโปรตีนออกจากตัวอย่างที่เราต้องการ เช่น เซลล์ ไวรัส เป็นต้น ต่อด้วยการแยกโปรตีน (Protein separation) เป็นขั้นตอนการแยกโปรตีนออกจากโมเลกุลอื่นๆผ่านคอลัมน์ให้เกิดความบริสุทธิ์ ซึ่งในขั้นตอนนี้มีวิธีการแยกที่หลากหลายขึ้นกับชนิดของโปรตีน และการนำโปรตีนไปใช้งาน จากนั้นขั้นตอนสุดท้ายคือการทำให้โปรตีนมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น (Concentrate protein) เมื่อโปรตีนถูก elute ผ่านคอลัมน์ โปรตีนจะเจือจางลงจากก่อนการทำให้บริสุทธิ์ จึงจำเป็นต้องทำให้โปรตีนมีความเข้มข้นมากขึ้นโดยสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การทำให้เป็นผงแห้ง (Lyophilization), การทำให้ปริมาตรลดลง (Ultrafiltration) เป็นต้น (18) เมื่อโปรตีนผ่านกระบวนการต่างๆที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วจึงนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยการทำ SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) โดยสังเกตแถบโปรตีนบนเจลว่ามีโปรตีนอื่นนอกจากโปรตีนที่ต้องการมากน้อยเพียงใด ก็จะบอกได้ถึงความบริสุทธิ์ของโปรตีนนั้น

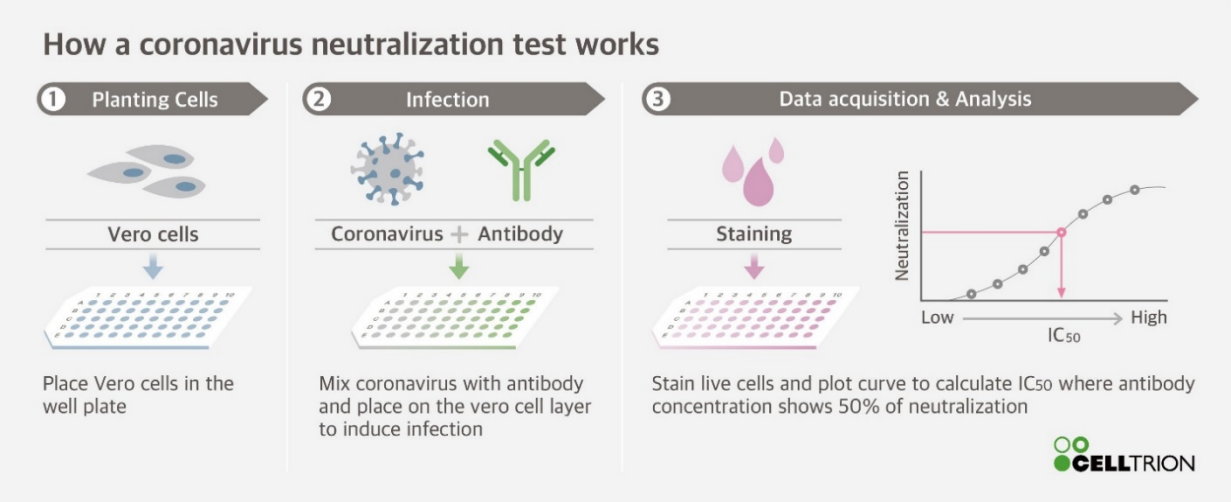
การตรวจวินิจฉัยโรคโควิด-19 ด้วย Enzyme link immunosorbent assay (ELISA) และ Virus Neutralization assay

การตรวจวินิจฉัยโรคโควิด-19 เป็นสิ่งทีสำคัญมากอย่างนึงในการควบคุมการระบาดและการพัฒนาวิธีรักษาโรค สามารถแบ่งได้เป็น การตรวจหาภูมิคุ้มกัน เช่น ELISA, การตรวจหา Neutralizing antibodies เช่น Neutralization assay และการตรวจหาแอนติเจน (antigen) เช่น RT-qPCR, ELISA เป็นวิธีการทดสอบเพื่อตรวจหาภูมิคุ้มกันในสารตัวอย่างโดยอาศัยหลักการการจับกันอย่างจำเพาะของแอนติบอดี (Antibody) และแอนติเจน (Antigen) ตรวจสอบผลโดยการทำปฏิกิริยาของสารตั้งต้นและเอนไซม์ (ภาพที่ 1.4) จากนั้นอ่านค่าด้วยเครื่องไมโครเพลท (Microplate reader) นับเป็นวิธีที่มีความไวสูง (Sensitivity) ส่วน Neutralization assay เป็นวิธีการทดสอบเพื่อตรวจหาภูมิคุ้มกันในสารตัวอย่าง เช่นเดียวกัน ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง (Specificity) และมีความแตกต่างจากวิธีการตรวจหาภูมิคุ้มกันวิธีอื่นที่สามารถตรวจหาภูมิคุ้มกันชนิดที่สามารถทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อนั้นๆได้อีกด้วยในขณะที่วิธีอื่นทราบเพียงว่าเคยพบเชื้อนั้นหรือไม่ วิธีการทดลองจะทำโดยนำสารตัวอย่างมาทำการเจอจางในความเข้มข้นต่างๆและเติมเชื้อที่ต้องการทดสอบในปริมาณคงที่เท่ากันในแต่ละความเข้มข้น จากนั้นดูผลการยังยั้งเชื้อ (ภาพที่ 1.5) ถ้าในตัวอย่างมีปริมาณภูมิคุ้มกันเพียงพอจะไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ แต่ถ้าภูมิคุ้มกันนั้นมีปริมาณไม่เพียงพอหรือไม่มีความสามารถในการทำลายเชื้อ เชื้อจะเจริญได้ เซลล์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงที่เรียกว่า Cytopathic effect (CPE) (7)



ภาพที่ 1.4 ภาพแสดงการทำ ELISA

(อ้างอิงจาก https://www.raybiotech.com/covid-19-human-iga-elisa-kit/?variation_id=191072)



ภาพที่ 1.5 ภาพแสดงการทำ Neutralization assay

(อ้างอิงจาก Coronavirus. World Health Organization. 2020 (Graphic: Business Wire))

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อผลิตโปรตีนหนามและ RBD ของ SARS-CoV-2 และทำให้บริสุทธิ์ จาก HEK293 เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคโควิด19

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

รู้เทคนิควิธีการผลิตโปรตีนจากเซลล์ ทราบความแตกต่างของความสามารถในการแสดงออกโปรตีนหนามในเซลล์ CHO-K1, HEK293 และการทำให้บริสุทธิ์ สามารถนำความรู้ดังกล่าวไปประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคต่อไป

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. จานเพาะเชื้อ
2. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น BV-124 (Tomy, Japan)
3. ไมโครปิเปต ขนาด 2, 2.5, 20, 100, 200, 1,000 ไมโครลิตร
4. ขวดรูปชมพู่ขนาด 100, 150 มิลลิลิตร
5. ขวดเก็บสาร ขนาด 50, 250, 500, 1,000 มิลลิลิตร
6. เข็มเขี่ยเชื้อปลายกลมและปลายแหลม
7. แท่งแก้วสามเหลี่ยม
8. หลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ ทิวป์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 1.5, 2 มิลลิลิตร
9. ปิเปตทิป (pipette tips) ขนาด 0.5-10, 200, 1,000 ไมโครลิตร
10. ถาดเลี้ยงเซลล์ 12 หลุม
11. เครื่องชั่งสาร รุ่น L2220 P (Scientific promotion)
12. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) รุ่น BV-124 (ISSCO)
13. ตู้เย็น (refrigerator) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (MITSUBISHI, Japan)
14. เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า
15. ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (SHARP, Japan)
16. ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส
17. เครื่องทำน้ำแข็ง รุ่น OF 146 (Newton, Thailand)
18. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G560E (Scientific industries, USA)
19. หลอด cryotube 2 มิลลิลิตร
20. ฮีโมไซโตมิเตอร์ บริษัท ISOLAB Laborgerate GmbH, Germany
21. ที่วางหลอดทดลอง (test tube rack)
22. เครื่องอ่านไมโครเพลท รุ่น Varioskan Flash Multimode (Thermo Fisher Scientific, USA)

23. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, Germany)
24. ชุดสกัดพลาสมิด (Midi prep kit Zymo research)
25. Ultra-Low Attachment 96-well plate (Corning Inc., USA)
26. กล้องจุลทรรศน์ บริษัท OLYMPUS CKX3-SLP (OLYMPUS, Japan)
27. ขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีฝาปิดตัวกรองขนาด 25, 75 ตารางเซนติเมตร (Nunc Thermo Fisher Scientific, USA)
28. ตู้บ่มเซลล์ที่มีการให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide incubator) รุ่น 311 (Thermo Elaectron Corporation, USA)
29. ชุดเครื่องมือทำ agarose gel electrophoresis (Mupid-2 plus)
30. ชุดเครื่องมือทำ SDS-PAGE (BIO-RAD)
31. ชุดเครื่องมือทำ semi-dry electrophoretic transfer (BIO-RAD)
32. Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane
33. อุปกรณ์ถ่ายภาพ Chemiluminescence (Uvitec Ltd, UK)
34. อุปกรณ์ถ่ายภาพ Gel documentation (Uvitec Ltd, UK)
35. Heating Block
36. หลอดไซริงค์พลาสติก ขนาด 10, 20 มิลลิลิตร
37. ไซริงค์ฟิลเตอร์ 0.45 ไมครอน
38. Centrifugal ultrafiltration filter unit (Amicon ultra 2 ml 30K device, Merck)
39. เครื่องทำ affinity chromatography (AKTA pure, Cytiva)
40. เครื่องวัด pH
41. เครื่องกรองน้ำ Type 1
42. Nanodrop (Thermo Scientific)
43. Sonicator
44. Dialysis bag
45. Magnetic stirrer
46. Rocking shaker

เคมีภัณฑ์

1. Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High glucose medium (DMEM) (Hyclone, USA)
2. Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High glucose medium (DMEM) (Gibco, USA)
3. Ham's F-12K (Kaighn's) medium (Hyclone, USA)
4. Bacto tryptone (BD bioscience)
5. Yeast extract (Gibco, USA)
6. Sodium chloride
7. Potassium chloride
8. Disodium hydrogen phosphate
9. Potassium dihydrogenphosphate
10. American bact agar
11. Geneticin (Gibco, USA)
12. Geneticin (invivoGen, USA)
13. Gentamycin (Gibco, USA)
14. Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, USA)
15. Trypsin-EDTA (Gibco, USA)
16. Gentamycin (Gibco, USA)
17. Sodium pyruvate (Hyclone, USA)
18. HEPES (Hyclone, USA)
19. Dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA)
20. Ethanol
21. Hypure water
22. Agarose
23. RIPA buffer
24. Protease inhibitor (Cell Signaling Technology, USA)
25. Phosphatase inhibitor (Cell Signaling Technology, USA)

26.Sodium dodecyl sulphate (SDS)

27.Tris buffer

28.Acrylamide (Bio-Rad Laboratories, USA)

29.TEMED (Bio-Rad Laboratories, USA)

30.Ammonium persulphate

31.B-mercapto-ethanol (Sigma-Aldrich, USA)

32.Absolute ethanol (Merck, Germany)

33.BCA protein assay kit (Thermo Scientific)

34.Trypan blue (Gibco, USA)

35.Anti-rabbit IgG-HRP (Cell signaling technology, USA)

36.Anti-SARS-CoV-2 spike mAb rabbit (Sino Biological, USA)

37.α His-Tag rabbit mAb (Cell signaling technology, USA)

38.*Escherichia coli* DH5α

39.HEK293 cell line

40.CHO-K1 cell line

41.Ampicilin

42.Plasmid pCI neo stabilized spike

43.Plasmid pCI neo RBD

44.Plasmid pCMV S1

45.Plasmid pCMV RBD

46.Plasmid pMAX-GFP

47.DNA ladder 1 kilobase

48.Gel red prestain loading buffer

49.Fugene HD Transfection reagent (Promega, USA)

50.Opti-mem

51.Luminol

52.Coumaric acid

53.Methanol

54.Tween 20

55.Skim milk (BD bioscience)

56.Sodium phosphate

57.Imidazole

58.Coomassie Brilliant blue

59.Destain solution

60.Soak gel solution

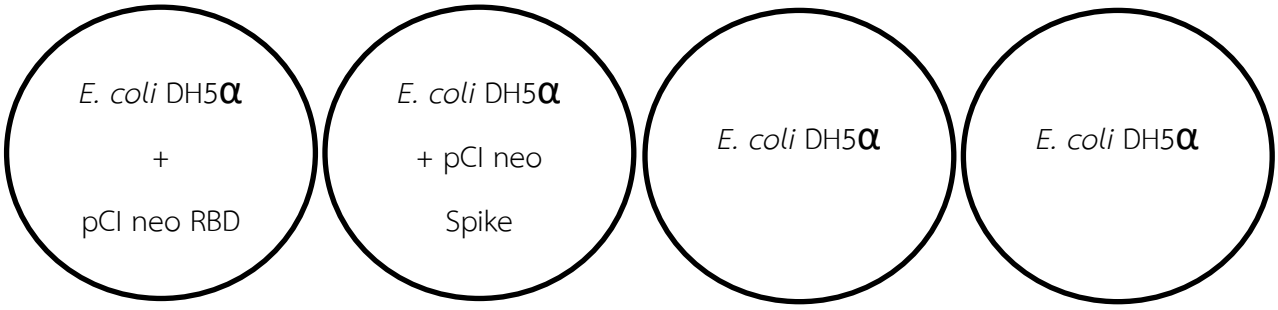
61.HisTrap HP His tag protein purification columns (Cytiva, USA)

วิธีดำเนินการทดลอง

1.การเตรียมพลาสมิด

พลาสมิดที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย pCI neo stabilized spike, pCI neo RBD, pCMV S1, pCMV RBD (พลาสมิด pCI neo ที่มียีน Spikeและ RBD จัดซื้อจากผู้ผลิต (https://www.biomatik.com) ผ่านการสังเคราะห์ DNA ส่วนพลาสมิด pCMV จัดซื้อจากบริษัท Sino Biological) เพื่อนำมาแสดงออกใน cell line โดยการทำ transfection ด้วย FuGene HD transfection reagent (nonliposomal) ซึ่งใน protocol ในการใช้ FuGene HD 1 ไมโครกรัม ซึ่งความเข้มข้นของ pCI neo stabilized spike และ pCI neo RBD มีเพียง 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จึงนำมาเพิ่มปริมาณพลาสมิด โดยนำพลาสมิดทั้งสองทำ transformation

ขั้นแรกเริ่มจากการเตรียม Luria-Bertani broth (LB broth) และ Luria-Bertani agar (LB agar) อย่างละ 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ของ LB broth เป็น 7.4 ส่วน LB agar เป็น 7.0 นำไป autoclave อุณหภูมิ 121°c (องศาเซลเซียส) ความดัน 15 psi (ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้นเท LB agar ลงเพลททั้งหมด 4 เพลท โดย 3 เพลท ใส่ยา ampicillin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (เตรียมจาก 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (ภาพที่ 2.1) เก็บไว้ใน ห้องเย็น (4°c)



ภาพที่ 2.1 แสดงการเตรียม LB agar เพื่อทำ transformation

ทำ transformation โดยเตรียมหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ 1.5 มิลลิลิตร บนน้ำแข็ง ใส่พลาสมิด 2 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นพลาสมิดไม่เกิน 100 นาโนกรัม) ใส่ *E. coli* DH5α 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นย้ายหลอดไปยัง heating block 42°c 1.5 นาที และ ย้ายกลับไปวางในน้ำแข็ง 2 นาที สุดท้ายใส่ LB broth 1 มิลลิลิตร บ่ม

ในเครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า 45-60 นาที เมื่อครบเวลานำมา 100 ไมโครลิตร spread ลงเพลททั้ง 4 บ่มในตู้บ่มเชื้อ 16-18 ชั่วโมง

คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวย้ายไปเพาะเลี้ยงต่อด้วย LB broth ในขวดรูปชมพูโดยแบ่งการ inoculate เชื้อเป็น 2 ครั้ง ครั้งแรกเติม LB broth 5 มิลลิลิตรและยา ampicillin 2 ไมโครลิตร บ่มในตู้บ่มเชื้อ 8 ชั่วโมง แล้วเติม LB broth 50 มิลลิลิตร ใส่ยา ampicillin 20 ไมโครลิตร และ inoculate 100 ไมโครลิตร จากครั้งแรก บ่มทิ้งไว้ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า 37°c เมื่อครบเวลานำมาเจือจาง 10 เท่าและวัด OD_{600} ควรอยู่ในช่วง 0.2-0.35 (ถ้าต่ำกว่าให้บ่มต่อ) จากนนั้นย้ายจากขวดรูปชมพู่มาใส่ใน conical tube 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ cool room 4°c

2.การสกัดพลาสมิด

นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 g 10 นาที 25°c ทิ้ง supernantant จากนั้นนำ pellet ไปสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด Midi prep kit (Zymo Reasearch) โดยมีขั้นตอนดังนี้ resuspend ด้วยสารละลาย P1 8 มิลลิลิตร เติม P2 8 มิลลิลิตร กลับด้านไปมา 6 ครั้ง รอ 2-3 นาที จากนั้น เติมสารละลาย P3 8 มิลลิลิตร และย้ายสารละลายลงใน syringe filter รอ 5-8 นาที นำ luer lock pluck ออกปล่อยสารละลายลงใน conical tube 50 มิลลิลิตร ใช้ plunger ดันสารละลายจนได้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติม binding buffer 8 มิลลิลิตร กลับด้านไปมา 8 ครั้ง แล้ววาง column assembly บน vacuum manifold เติมสารละลายก่อนจึงเปิด vacuum และปิด vacuum เมื่อสารละลายไหลหมด นำ reservoir ออกจาก column assembly เติมสารละลาย wash1 2 มิลลิลิตร เปิด vacuum จนสารละลายไหลหมด เติมสารละลาย wash2 2 มิลลิลิตร เปิด vacuum จนสารละลายไหลหมด ทำซ้ำ 2 รอบ จากนั้นถอด luer lock และทิ้ง conical reservoir นำส่วน column ใส่ใน collection tube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 g 1 นาที และย้าย column ไปใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร สุดท้ายเติม elution buffer 100 ไมโครลิตร รอ 2 นาทีแล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 g 1 นาที เก็บไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ -20°c

3.การวัดปริมาณและคุณภาพพลาสมิด

วัดปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง nanodrop ใช้ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร โดยใช้ blank เป็น elution buffer และเจือจางความเข้มข้นพลาสมิดจากที่วัดได้ให้เป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำ gel electrophoresis (เตรียม 1.5% agarose gel) รันเจลโดยผสม พลาสมิด 1 ไมโครลิตร, gel red 1 ไมโครลิตร, 6X dye 1 ไมโครลิตร, MiliQ water 3 ไมโครลิตร และใช้ ladder ขนาด 1 กิโลเบส รันโดยใช้กำลังไฟ 100 โวลต์ 30 นาที เมื่อรันเสร็จนำเจลไปส่องด้วยเครื่อง gel doc

4.การเลี้ยง cell line

เลี้ยงเซลล์ HEK293 (ATCC) และ CHO-K1 (ATCC) โดยนำออกจากตู้ -80°c มาอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37°c เตรียม conical tube ขนาด 15 มิลลิลิตร เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 9 มิลลิลิตร (HEK293 เลี้ยงโดยใช้ Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High glucose medium (DMEM), CHO-K1 เลี้ยงโดยใช้ Ham's F-12K (Kaighn's) medium) และเติมเซลล์ 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 1,000 rpm 5 นาที จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งดีดบริเวณก้นหลอกเล็กน้อยให้เซลล์หลุดออกจากผิวหลอดและเติม complete media 1 มิลลิลิตร นำเซลล์ที่ได้ไปปนับด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ โดยเจือจางเซลล์ด้วย 1X PBS 4 เท่า แล้วผสม trypan blue ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เพื่อนำไปเลี้ยงต่อในภาชนะ T25 หรือ T75 ในปริมาณที่เหมาะสม โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°c ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง

5.การนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบบชั่วคราว (transient transfection)

5.1 Transient transfection โดยใช้ Fugene HD Transfection reagent

เลี้ยงเซลล์ HEK293 จำนวน 2 x 10^5 เซลล์ต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร ส่วนเซลล์ CHO-K1 จำนวน 1 x 10^5 ต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร ในภาชนะ 12-well plate อุณหภูมิ 37°c ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรต่อหนึ่งปฏิกิริยา เพื่อผสมพลาสมิด 1.1 ไมโครลิตร, optimum 50.9 ไมโครลิตร Fugene HD 3.3 ไมโครลิตร [2] กลับด้านหลอดไปมา 15 ครั้ง บ่มที่

อุณหภูมิห้อง 5-10 นาที แล้วเติมสารละลายที่ได้ 50 ไมโครลิตรให้ทั่วแต่ละหลุมและเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37°c ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

5.2 Calcium phosphate-mediated transfection

เลี้ยงเซลล์ HEK293 จำนวน 2 x 10^5 เซลล์ต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร ส่วนเซลล์ CHO-K1 จำนวน 1 x 10^5 ต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร ในภาชนะ 12-well plate อุณหภูมิ 37°c ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ จากนั้นเตรียมหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร 2 หลอดต่อหนึ่งปฏิกิริยา โดยหลอดแรกใส่ 2M $CaCl_2$ 8 ไมโครลิตร, พลาสมิด 2.1 ไมโครลิตรและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็น 62.5 ไมโครลิตร ส่วนอีกหลอดใส่ 2X HBX 62.5 ไมโครลิตร แล้วผสมทั้งสองหลอดโดยเติมหลอดแรกไปยังหลอดที่สอง บ่มอุณหภูมิห้อง 20 นาที เติมสารละลายที่ได้ 125 ไมโครลิตรให้ทั่วแต่ละหลุมและเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37°c ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 6 ชั่วโมงจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์อีกครั้ง บ่มต่อที่สภาวะเดิม 24-48 ชั่วโมง

6.การนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบบถาวร (stable transfection)

ทำการนำเข้าพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ในขั้นตอนเดียวกันการนำเข้าพลาสมิดแบบชั่วคราวแต่เมื่อบ่มจนครบเวลาแล้วให้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์โดยผสมยาที่ใช้คัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดซึ่งเลือกจากยีนต้านยาที่มีในพลาสมิดนั้นๆ ความเข้มข้นของยาที่ใช้เลือกจากการทำ optimization โดยเลือกความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเซลล์ปกติได้ทั้งหมด เมื่อเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมยาแล้วให้สังเกตุเซลล์และสีของอาหารถ้าเซลล์โตเต็มหลุมให้ทำการพาสเซลล์ ถ้าสีอาหารเปลี่ยนให้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ ทำเช่นนี้จนครบ 14 วัน

7.การสกัดโปรตีนจากเซลล์

ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกล้างด้วย PBS 2 ครั้งเติม RIPA buffer 539 มิลลิลิตร, Protease 5.5 มิลลิลิตร, Phosphatase 5.5 มิลลิลิตร ลงในหลุม จากนั้นดูดออกจากหลุมไปยังหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 g 15 นาที 4°c สุดท้ายดูดสารละลายด้านบนใส่หลอดเก็บที่อุณหภูมิ -80°c

8.การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วย BCA assay และนำมาแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE โดยใช้ SDS-Polyacrylamide gel ที่มีความเข้มข้นของ acrylamide ใน separating gel 15% สำหรับโปรตีน RBD, 8% สำหรับโปรตีน Spike ใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 V เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นโอนถ่ายโปรตีนจากเจลไปยัง polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 80 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 90 นาที ต่อ 1 เจล แล้วนำ PVDF membrane มาแช่ใน blocking solution (3% skim milk ใน PBST) เป็นเวลา 5 นาที 2 รอบ จากนั้นแช่ต่อในแอนติบอดีปฐมภูมิ (primary antibody) (เลือกใช้ตามตารางที่ 2.1) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°c ทิ้งไว้ข้ามคืน ต่อมาล้างด้วย PBST เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง 15 นาทีอีก 2 ครั้งแล้วเติมแอนติบอดีทุติยภูมิ (secondary antibody) (เลือกใช้ตามตารางที่ 2.1) ที่มี Horse-Radish peroxidase ติดฉลากอยู่ปริมาตร 4 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง สุดท้ายล้างด้วย PBST เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง 15 นาทีอีก 2 ครั้งและนำไปตรวจดูด้วยเครื่อง Chemiluminescence โดยใส่สารละลายที่ประกอบด้วย 100 mM Tris pH 8.5, Coumaric acid, Luminol และ Hydrogenperoxide ทิ้งไว้เวลา 1 นาที แล้วนำเข้าเครื่อง chemiluminescence เพื่อตรวจสอบสัญญาน

โปรตีนจากพลาสมิด	อัตราส่วนแอนติบอดีปฐมภูมิต่อ blocking solution	อัตราส่วนแอนติบอดีทุติยภูมิต่อ blocking solution
pCI neo stabilized spike	α His-Tag rabbit mAb 1:4000	Anti Rabbit HRP 1:4000
pCI neo RBD	α His-Tag rabbit mAb 1:4000	Anti Rabbit HRP 1:4000
pCMV S1	Anti SARS-CoV-2 spike mAb rabbit 1:1000	Anti Rabbit HRP 1:4000
pCMV RBD	Anti SARS-CoV-2 spike mAb rabbit 1:1000	Anti Rabbit HRP 1:4000

ตารางที่ 2.1 แสดงแอนติบอดีที่ใช้ในการทำ Western blot

9.การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยวิธี column chromatography

ผสมโปรตีนกับ binding buffer ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 และนำไปไล่แก๊ซด้วย sonicator 10 นาที ปรับ flow rate ของเครื่องเป็น 2 มิลลิลิตรต่อนาทีล้างทุกสายของเครื่องด้วย 20% ethanol จนกราฟที่แสดงจากเครื่องเป็นเส้นตรง แล้วใส่ column (ปรับ flow rate เป็น 1 มิลลิลิตรต่อนาที) ด้านบนก่อนด้านล้าง ระมัดระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ จากนั้นล้างทุกสายด้วยน้ำกลั่นจนกราฟเป็นเส้นตรง นำ binding buffer, elution buffer, โปรตีน, บีกเกอร์ และหลอดใส่โปรตีนหลังทำให้บริสุทธิ์ วางไว้แต่ละตำแหน่งของเครื่อง AKTA [1] เลือก method run ตั้งค่าดังนี้ 1.binding 5 นาที 2.Sample ... นาที (เวลาตามปริมาตรโปรตีน) 3.wash binding 15 นาที 4.elution 12 fraction 5.binding 5 นาที เมื่อเสร็จแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น, 20% ethanol แล้วจึงถอด column ออกและ ล้าง MilliQ water จนกราฟเป็นเส้นตรง

10.การทำให้โปรตีนมีความเข้มข้นมากขึ้นด้วยวิธี Ultrafiltration

ประกอบอุปกรณ์ส่วน filtration (30 kilodalton) กับ collection tube แล้วใส่โปรตีนลงในส่วน filtration และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 g อุณหภูมิ 25°c เป็นระยะเวลา 2 นาที สุดท้ายเก็บส่วน collection tube ที่อุณหภูมิ -20°c

11.การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยการแยกสารผ่านเยื่อ (dialysis)

เตรียม 1XPBS จำนวน 3 ลิตร, บีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร, จานเพาะเชื้อ, หลอดดูดสารขนาด 10 มิลลิลิตร, dialysis bag, เชือก, กรรไกร ,ที่หนีบถุง และmagnetic stirrer เริ่มจากเท PBS เล็กน้อยลงบน จานเพาะเชื้อและนำ dialysis bag ลงไปแช่ มัดปลายถุงด้านหนึ่งด้วยเชือกให้แน่นและนำที่หนีบมาหนีบถุง จากนั้นใส่โปรตีนลงไปในถุงมัดปากถุงด้วยเชือกและหนีบถุงด้วยตัวหนีบ นำปลายเชื่อกที่เหลือห้อยบริเวณด้านข้างบีกเกอร์ ใส่ magnetic stirrer ลงไปและเติม PBS จนท่วม dialysis bag แต่ไม่ถึงบริเวณขอบด้านบนที่มัดไว้ จากนั้นนำไปวางไว้บนเครื่อง stirrer ในห้อง cool room เป็นระยะเวลา 3 วัน โดยเปลี่ยน PBS ทุกวันเมื่อครบ 24 ชั่วโมง แล้วจึงมานำโปรตีนออกโดยการตัดถุงและนำปิเปตมาดูดสารออก

12.การทดสอบ Binding activity ของโปรตีนที่ผลิตขึ้น โดยวิธี ELISA

ทำการเคลือบโปรตีนบน microplate ปริมาณ 2 ไมโครกรัมต่อหลุม บ่ม 4^{O}C 16 ชั่วโมง เติม blocking buffer 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่ม 37^{O}C 1 ชั่วโมง เติมเซรั่มจากผู้ป่วยโควิด-19 หรทอจากผู้ที่ได้รับวัคซีน บ่ม 37^{O}C 1 ชั่วโมง เติม secondary antibody (Anti Human IgG HRP) บ่ม 37^{O}C 1 ชั่วโมง เติม TMB substrate บ่มที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติม stop solution 100 ไมโครลิตรต่อหลุม และนำไปวัดค่าดูดคืนแสงด้วย microplate reader

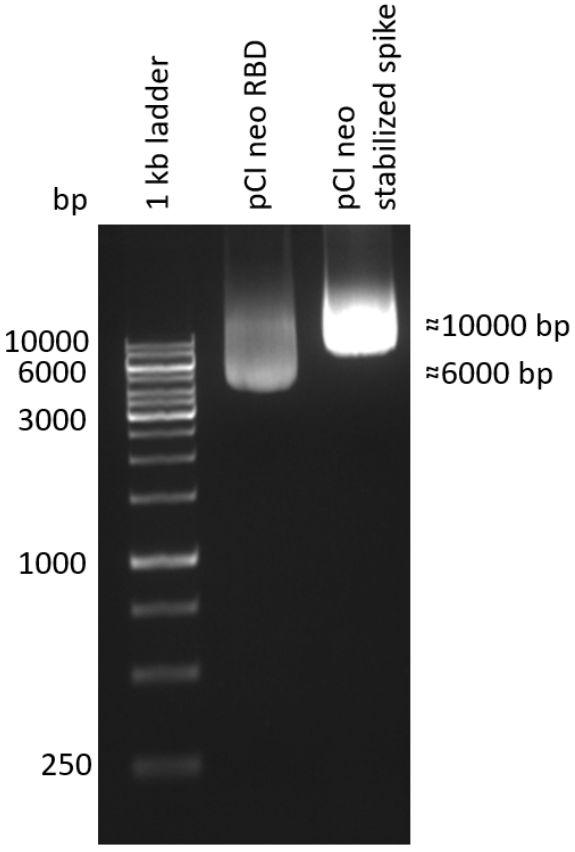
บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 ปริมาณและคุณภาพของพลาสมิด

ผลการวัดปริมาณ DNA ของพลาสมิดด้วยเครื่อง nanodrop ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร พบว่าปริมาณกรดนิวคลีอิคของพลาสมิด pCI neo RBD มีความเข้มข้น 4,620.7 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ส่วนพลาสมิด pCI neo stabilized spike มีความเข้มข้น 10,079.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

หลังจากเจือจางพลาสมิดทั้งสองจนได้ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรและนำไปทำ gel electrophoresis พบแบนด์พลาสมิดขนาดใกล้เคียงกับขนาดพลาสมิดจริงเมื่อเทียบกับ DNA ladder ขนาด 1 กิโลเบส (thermofisher) โดยพลาสมิด pCI neo RBD มีขนาดประมาณ 6,000 คู่เบส และพลาสมิด pCI neo stabilized spike ขนาดประมาณ 10,000 คู่เบส (ภาพที่ 3.1)



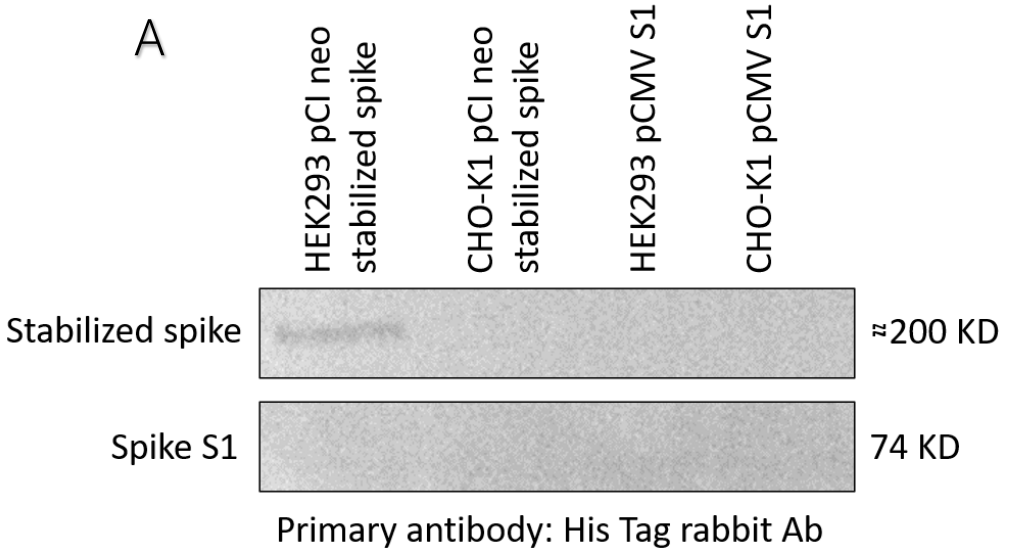
ภาพที่ 3.1 การวิเคราะห์พลาสมิดโดยวิธี gel electrophoresis

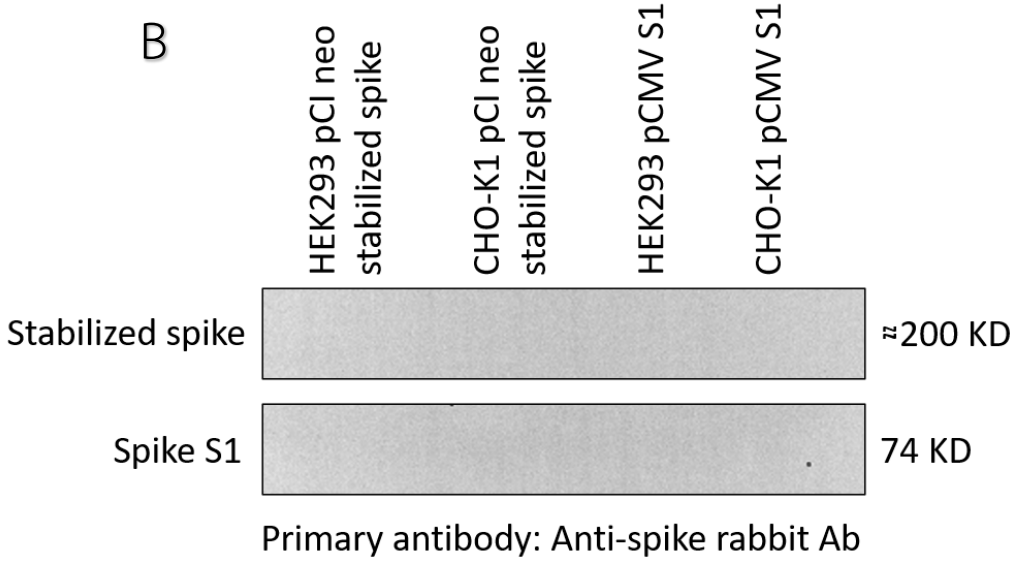
ทำ gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel 1.5% รันโดยใช้กำลังไฟ 100 โวลต์ 30 นาที

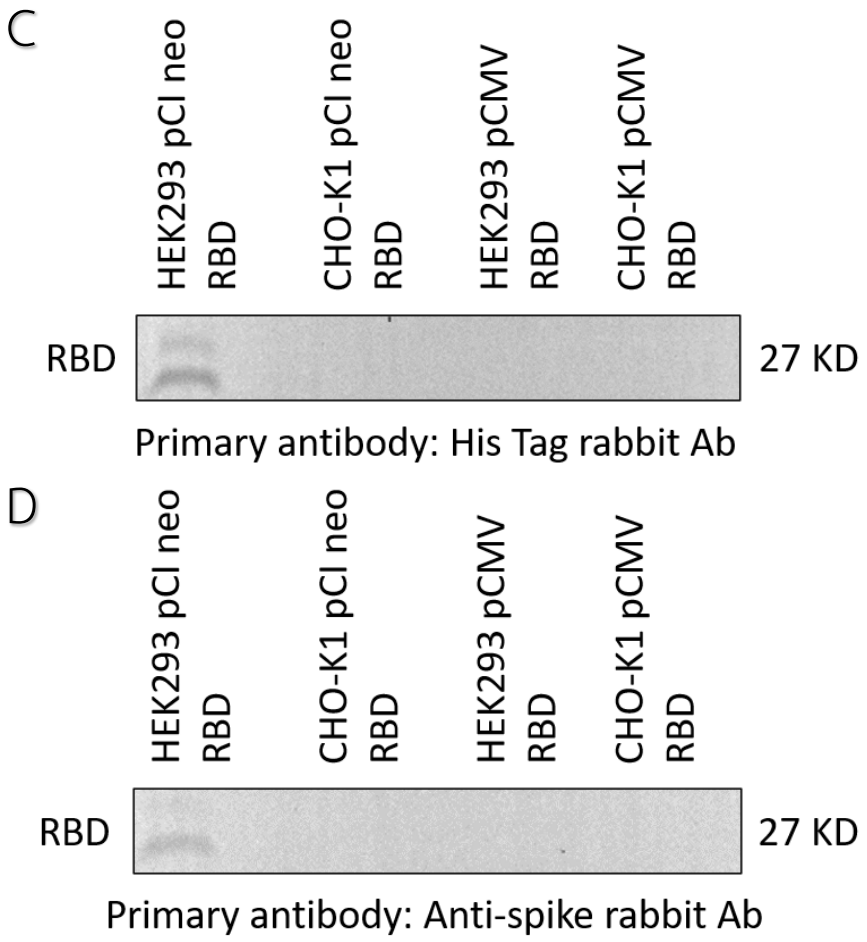
3.2 ผลการแสดงออกของโปรตีน S และ RBD ในการนำเข้าพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบบชั่วคราว

ผลการนำเข้าพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ HEK293 และ CHO-K1 โดยใช้ Fugene HD transfection reagent ซึ่งทดสอบด้วยการนำเซลล์มาสกัดโปรตีนและอาหารเลี้ยงเซลล์หลังจากการนำเข้าพลาสมิด 2 วันมาทำ Western blot พบว่ามีเพียงอาหารเลี้ยงเซลล์ HEK293 ที่มีพลาสมิด pCI neo stabilized spike และ pCI neo RBD ที่พบการแสดงออกของโปรตีนตรวจวิเคราะห์โดยใช้แอนติบอดีต่อ His tag (ภาพที่ 3.2A,C)

เมื่อนำเมมเบรนด์เดิมมา reprobe อีกครั้งด้วย Anti-spike rabbit Ab พบสัญญาณอ่อนๆจากโปรตีนที่ผลิตจากเซลล์ HEK293 ที่มีพลาสมิด pCI neo RBD (ภาพที่ 3.2D) แต่ไม่พบสัญญาณจากโปรตีนของเซลล์ HEK293 ที่มีพลาสมิด pCI neo stabilized spike (ภาพที่ 3.2B)







ภาพที่ 3.2.1 ตรวจติดตามการแสดงออกโปรตีนของเซลล์ HEK293 และ CHO-K1 โดยวิธี Western blot

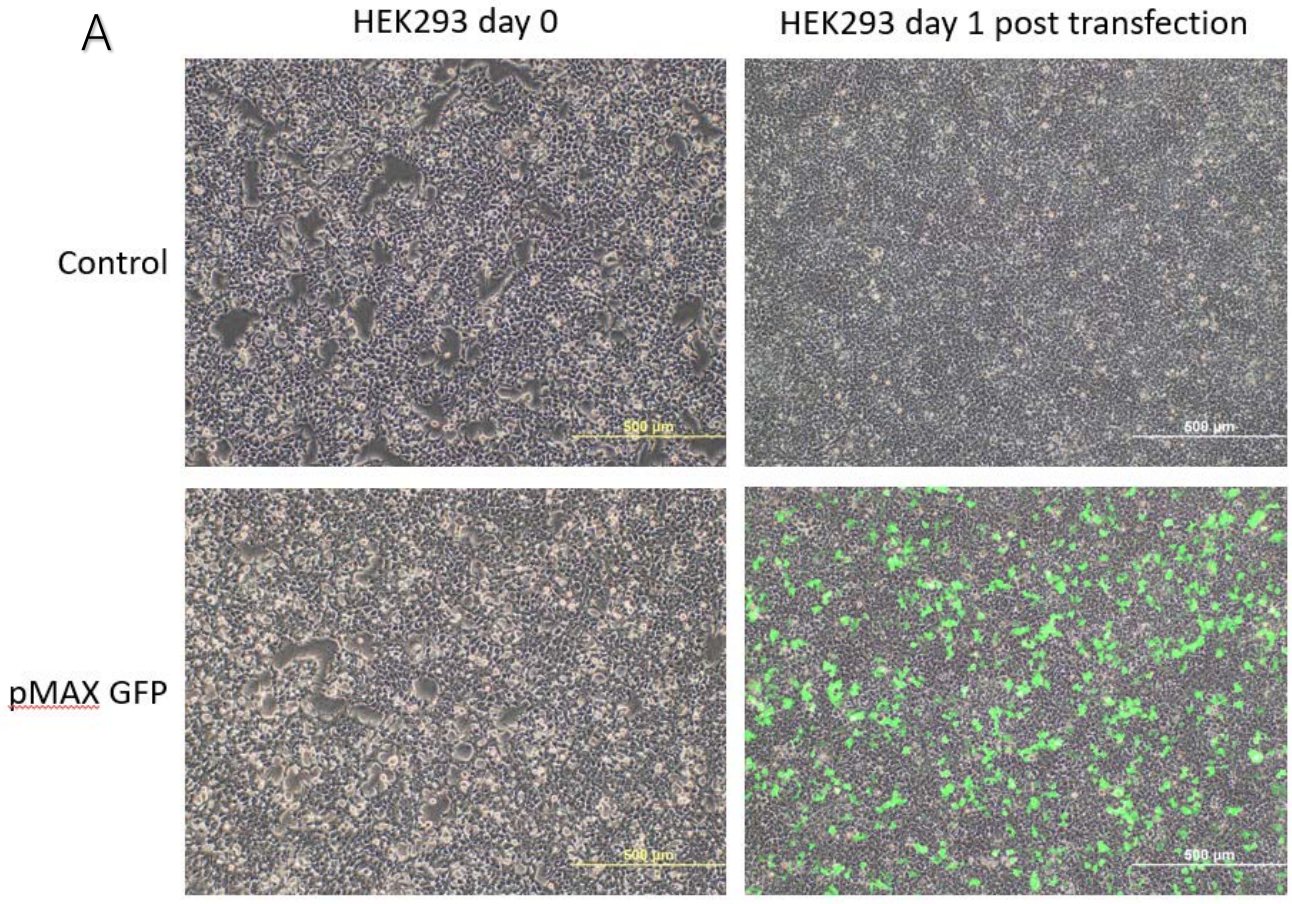
(A) ตรวจติดตามการแสดงออกโปรตีนของเซลล์ HEK293 และ CHO-K1 ที่มีพลาสมิด pCI neo stabilized spike โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์ (2 วันหลังจากการนำเข้าเซลล์) มาทำ Western blot โดยมี primary antibody คือ α His tag rabbit mAb (dilution 1:4000 3% skim milk)

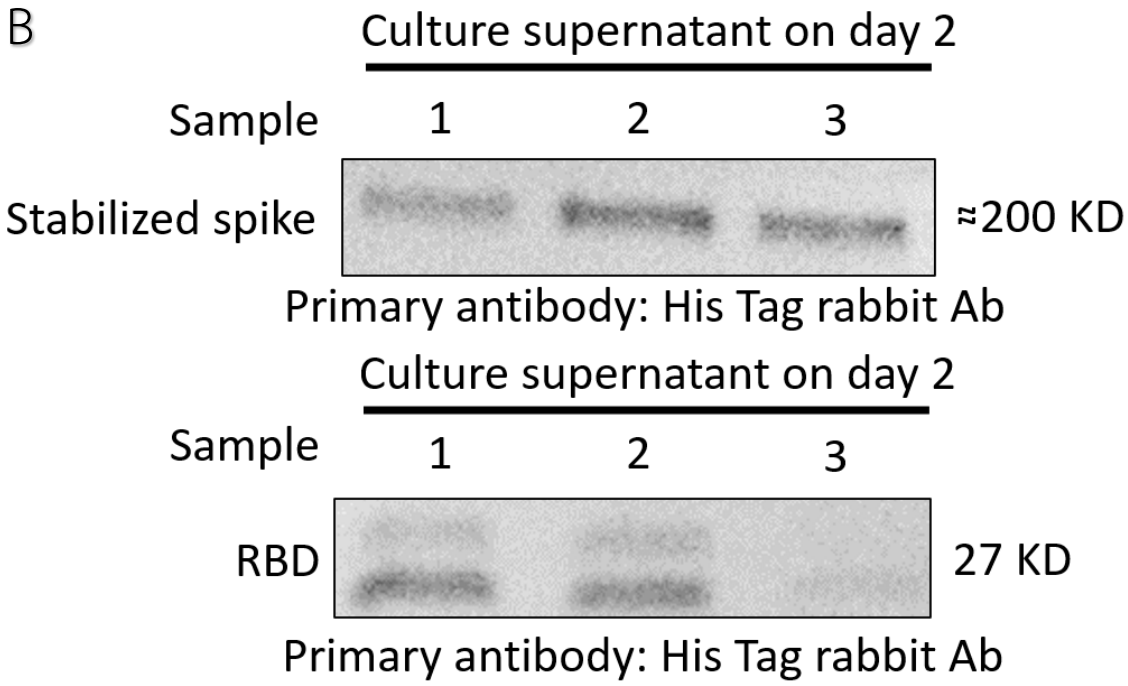
(B) ตรวจติดตามการแสดงออกโปรตีนของเซลล์ HEK293 และ CHO-K1 ที่มีพลาสมิด pCMV S1 โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์ (2 วันหลังจากการนำเข้าเซลล์) มาทำ Western blot โดยมี primary antibody คือ Anti-spike rabbit Ab (dilution 1:1000 3% skim milk)

(C) ตรวจติดตามการแสดงออกโปรตีนของเซลล์ HEK293 และ CHO-K1 ที่มีพลาสมิด pCI neo RBD โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์ (2 วันหลังจากการนำเข้าเซลล์) มาทำ Western blot โดยมี primary antibody คือ α His tag rabbit mAb (dilution 1:4000 3% skim milk)

(D) วัดการแสดงออกโปรตีนของเซลล์ HEK293 และ CHO-K1 ที่มีพลาสมิด pCMV RBD โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์ (2 วันหลังจากการนำเข้าเซลล์) มาทำ Western blot โดยมี primary antibody คือ Anti-spike rabbit Ab (dilution 1:1000 3% skim milk)

เพื่อให้การนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์มีราคาต้นทุนต่ำลงจึงศึกษาผลการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์โดยใช้ calcium phosphate ซึ่งผลการนำเข้าพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ HEK293 ด้วยวิธี Calcium phosphate-mediated transfection โดยทดสอบด้วยการนำเซลล์ที่มีการนำเข้าพลาสมิด pMAX GFP ไปส่องด้วย fluorescence microscope พบว่าวิธีดังกล่าวสามารถนำเข้าพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ HEK293 ได้ (ภาพที่ 3.2.2A) เมื่อนำอาหารเลี้ยงเซลล์ของเซลล์ที่นำเข้าพลาสมิด pCI neo stabilized spike และ pCI neo RBD มาทำ Western blot พบว่าเซลล์ HEK293 สามารถแสดงออกโปรตีนจากพลาสมิดทั้งสองได้เช่นกัน (ภาพที่ 3.2.2B)





ภาพที่ 3.2.2 การแสดงออกโปรตีนของเซลล์ HEK293 เมื่อนำเข้าพลาสมิดด้วยวิธี Calcium phosphate-mediated transfection

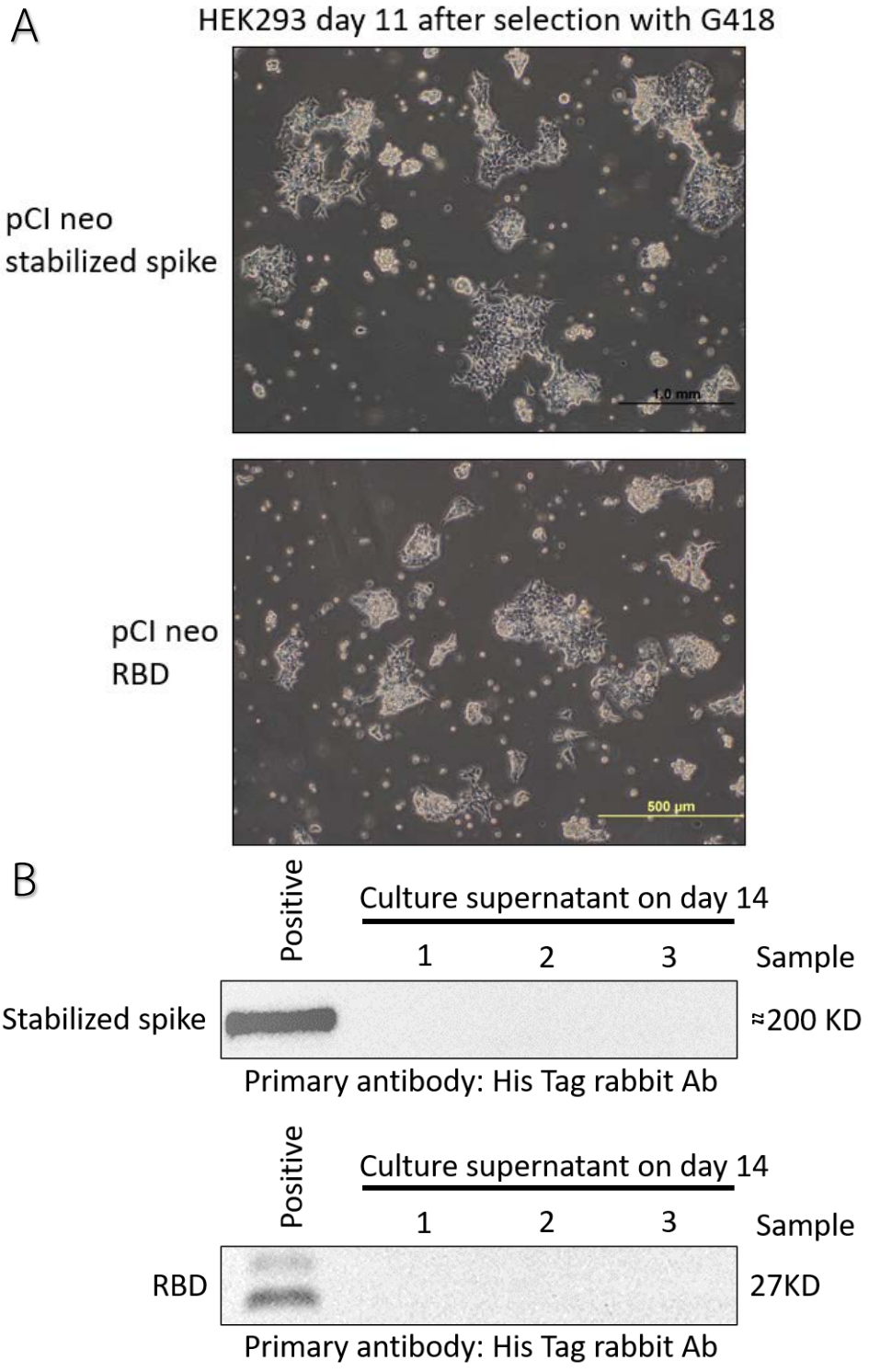
(A) การทดสอบประสิทธิภาพการนำเข้าพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ HEK293 ด้วยวิธี Calcium phosphate-mediated transfection โดยนำเซลล์หลังจากการนำเข้าเซลล์ 1 วันมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ fluorescence

(B) การทดสอบการแสดงออกโปรตีนของเซลล์ HEK293 ที่มีพลาสมิด pCI neo stabilized spike และ pCI neo RBD โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์ (2 วันหลังจากการนำเข้าเซลล์) มาทำ Western blot โดยมี primary antibody คือ α His tag rabbit mAb (dilution 1:4000 3% skim milk)

3.3 ผลการนำเข้าพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบบถาวร

เมื่อนำเซลล์ HEK293 ที่ทดสอบการแสดงออกโปรตีนจากการนำเข้าพลาสมิดมาคัดเลือกโดยใช้ยา G418 ที่ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเลี้ยงต่อจนครบ 14 วันพบว่าเซลล์ HEK293 บางส่วนยังคงเจริญได้ (ภาพที่ 3.3A) แสดงถึงการได้รับพลาสมิดที่มียีนต้านยา G418 หรือ neomycin แต่เมื่อนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปทำ

Western blot พบว่าเซลล์ HEK293 ที่ถูกคัดเลือกไม่สามารถผลิตออกโปรตีนออกมาได้เหมือนก่อนการคัดเลือก (ภาพที่ 3.3B)



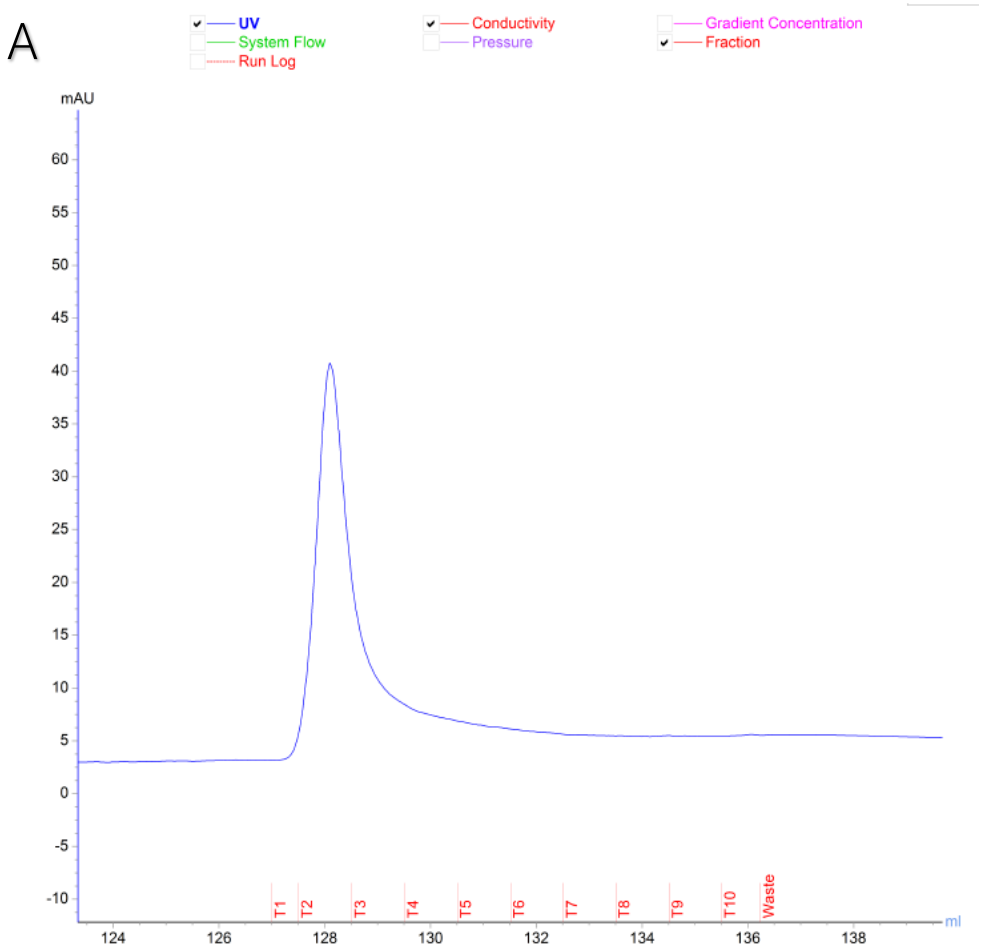
ภาพที่ 3.3 ลักษณะและการแสดงออกโปรตีนของเซลล์ HEK293 หลังจากถูกคัดเลือกด้วยยา G418

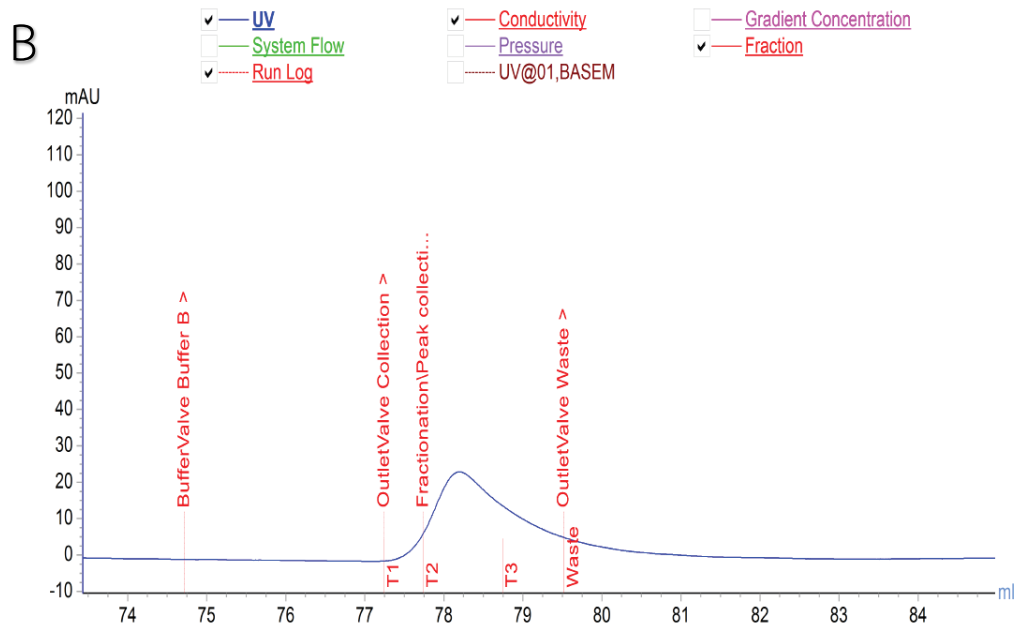
(A) ลักษณะของเซลล์ HEK293 เมื่อใส่ยา G418 ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปเป็นระยะเวลา 11 วัน และนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

(B) ทดสอบการแสดงออกโปรตีนของเซลล์ HEK293 เมื่อใส่ยา G418 ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปเป็นระยะเวลา 14 วัน (เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่ออาหารเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลือง) และนำอาการเลี้ยงเซลล์มาทำ Western blot โดยมี primary antibody คือ α His tag rabbit mAb (dilution 1:4000 3% skim milk)

3.4 ผลการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

จากการนำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการทำ transfection ด้วย calcium phosphate ผ่านการทดสอบด้วย Western blot แล้วพบโปรตีนที่ถูกแสดงออกจากการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ HEK293 มาทำการ purification โดยวิธี affinity column chromatography พบว่าโปรตีน spike และ RBD ที่ทำให้บริสุทธิ์พบโปรตีนที่ elution ที่ 2 และ 3 เมื่อดูจากกราฟ chromatogram (ภาพที่ 3.4.1A,B)



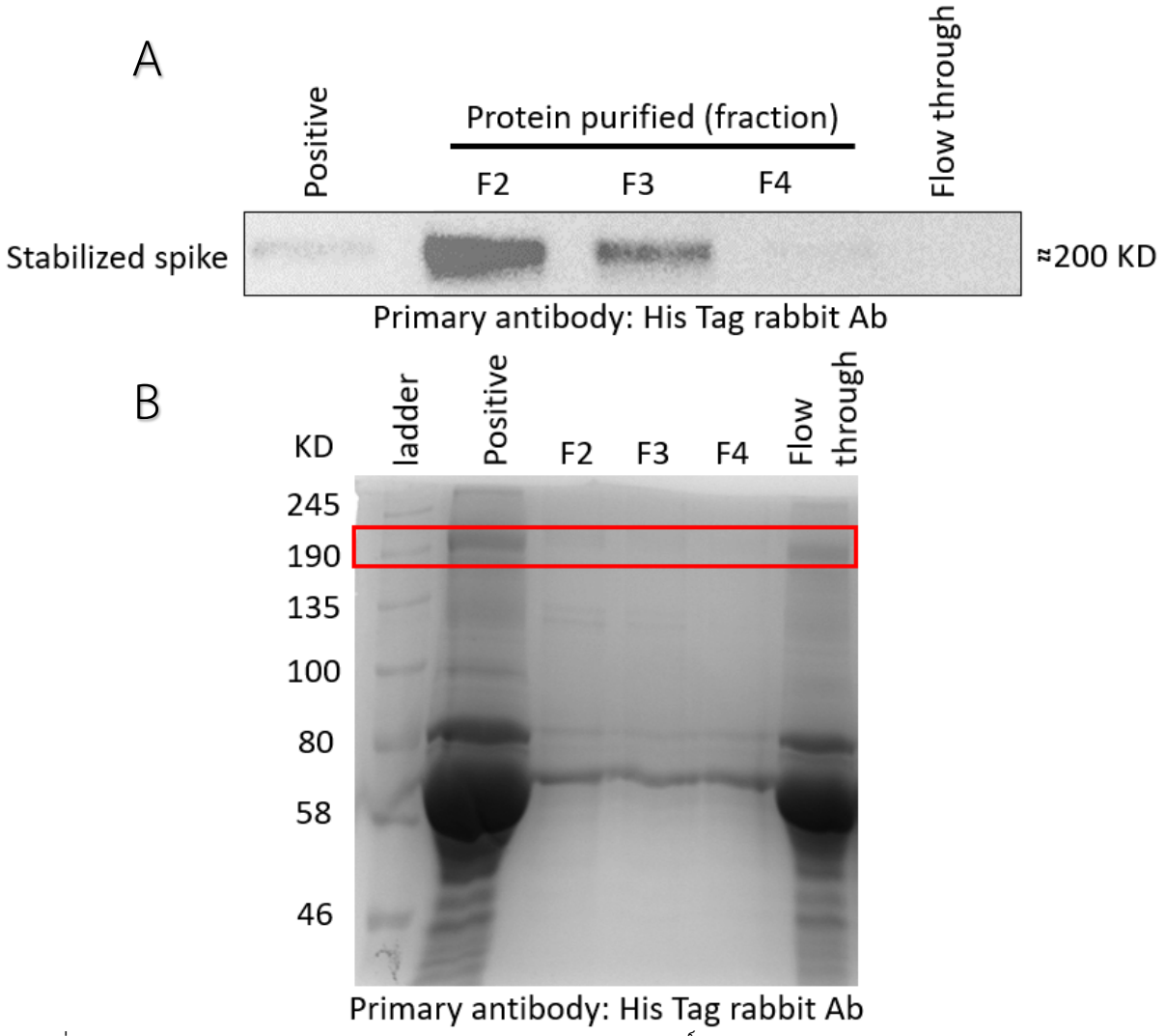


ภาพที่ 3.4.1 กราฟ chromatogram จากเครื่อง AKTA แสดงการ elution โปรตีนออกมาในแต่ละ fraction

(A) กราฟ chromatogram ของโปรตีน Spike ทำให้บริสุทธิ์โดย affinity chromatography

(B) กราฟ chromatogram ของโปรตีน RBD ทำให้บริสุทธิ์โดย affinity chromatography

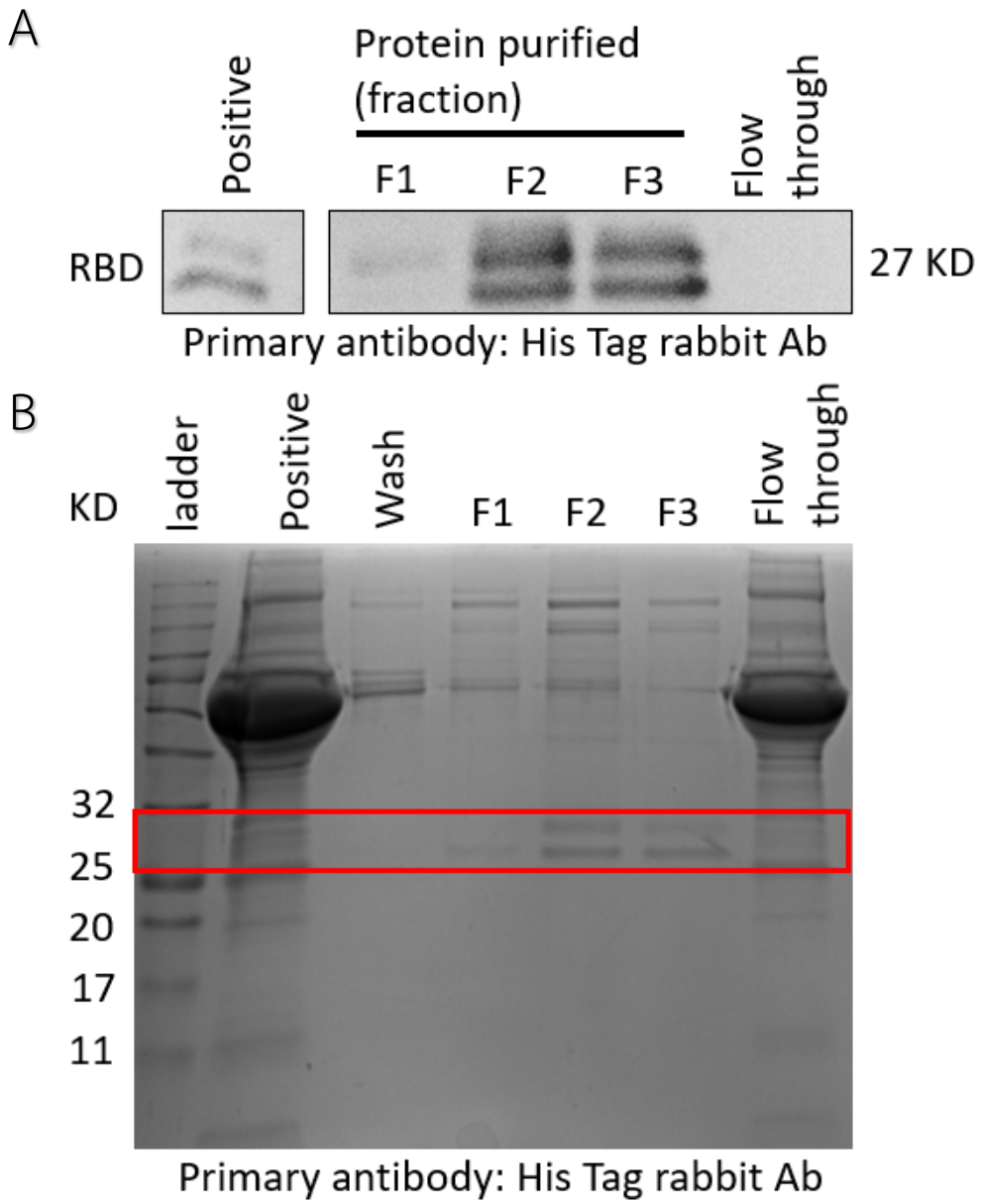
เมื่อนำโปรตีน Spike ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์นำไปทำ Western blot และ SDS-PAGE พบแบนด์โปรตีน spike ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์จากการทำ Western blot อย่างชัดเจน โดยพบโปรตีนที่ elution ที่ 2 และ 3 แต่ผลจากการทำ SDS-PAGE พบแบนด์โปรตีน Spike ค่อนข้างบาง และมีการปนเปื้อนโปรตีนอื่นน้อยกว่าโปรตีน Spike ที่ไม่ถูกทำให้บริสุทธิ์ (ภาพที่ 3.4.2A,B) ส่วนโปรตีน RBD พบแบนด์โปรตีนจากการทำ Western blot ชัดเจน โดยพบโปรตีนที่ elution ที่ 2 และ 3 ผลจากการทำ SDS-PAGE ก็เห็นแบนด์โปรตีนอย่างชัดเจนเช่นเดียวกัน ซึ่งมีความบริสุทธิ์มากกว่า โปรตีน RBD ที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (ภาพที่ 3.4.3A,B)



ภาพที่ 3.4.2 การทดสอบโปรตีน Spike หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธี Western blot และ SDS-PAGE

(A) ทดสอบโปรตีน Spike หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง AKTA โดยใช้ imidazole ในการ elution 500 mM ทดสอบโดยวิธี Western blot มี primary antibody คือ α His tag rabbit mAb (dilution 1:4000 3% skim milk)

(B) ทดสอบโปรตีน Spike หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง AKTA โดยใช้ imidazole ในการ elution 500 mM ทดสอบโดยวิธี SDS-PAGE มี Positive control คือ โปรตีนก่อนการทำให้บริสุทธิ์ และย้อมด้วยสี Coomassie blue



ภาพที่ 3.4.3 การทดสอบโปรตีน RBD หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธี Western blot และ SDS-PAGE

(A) ทดสอบโปรตีน RBD หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง AKTA โดยใช้ imidazole ในการ elution 250 mM ทดสอบโดยวิธี Western blot มี primary antibody คือ α His tag rabbit mAb (dilution 1:4000 3% skim milk)

(B) ทดสอบโปรตีน RBD หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง AKTA โดยใช้ imidazole ในการ elution 250 mM ทดสอบโดยวิธี SDS-PAGEมี Positive control คือ โปรตีนก่อนการทำให้บริสุทธิ์ และย้อมด้วยสี Coomassie blue

3.5 ผลการทดลองการทำให้โปรตีนมีความเข้มข้นขึ้นด้วยวิธี Ultrafiltration

เมื่อวัดความเข้มข้นโปรตีน Spike หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี BCA protein assay พบว่าโปรตีน Spike ที่ fraction ที่ 2 และ 3 มีความเข้มข้น 56.3, 24.4 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรตามลำดับ แต่เมื่อนำมาทำ Ultrafiltration และวัดปริมาณโปรตีนอีกครั้งพบว่าโปรตีน Spike ที่ fraction ที่ 2 และ 3 มีความเข้มข้น 371, 320 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรตามลำดับ

3.6 ผลการทดลองการทำ Dialysis ด้วย Dialysis bag

หลังจากการใส่โปรตีนไปยัง dialysis bag และแช่ทิ้งไว้ใน 1X PBS เป็นเวลา 3 วันและเมื่อนำโปรตีนออกจากถุง มีโปรตีนบางส่วนที่ไม่สามารถนำออกมาได้หมดทำให้ปริมาตรโปรตีนที่ได้ลดลงจากเดิม และเนื่องด้วยสถานการณ์การแพร่ระบาดของโควิด-19 ทำให้ยังไม่ได้ทำการทดลองต่อในส่วนของการทดสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่ผ่านการ dialysis ซึ่งควรจะมีการปนเปื้อนโปรตีนอื่นๆ น้อยลงกว่าเดิม

3.7 ผลการทดสอบ Binding activity ด้วย ELISA

เนื่องด้วยสถานการณ์การแพร่ระบาดของโควิด-19 ทำให้ไม่สามารถทำการทดลองในส่วนของการทดลองนี้

บทที่ 4

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากผลการทดลองการนำเข้าพลาสมิดทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ pCI neo stabilized spike, pCI neo RBD, pCMV S1 และ pCMV RBD เข้าสู่เซลล์ HEK293 และ CHO-K1 ผลปรากฏว่ามีเพียงเซลล์ HEK293 ที่ได้รับพลาสมิด pCI neo stabilized spike และ pCI neo RBD ที่สามารถแสดงออกโปรตีนจากพลาสมิดออกมาได้ โปรตีน Spike และ RBD ควรจะมีขนาดประมาณ 200, 27 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ซึ่งขนาดโปรตีน Spike ที่ได้จากการทำ Western blot เมื่อเทียบกับ protein ladder พบว่าอยู่เหนือ ladder ขนาด 190 กิโลดาลตัน ส่วนโปรตีน RBD พบแบนด์โปรตีนสองแบนอยู่ระว่าง ladder ขนาด 25-32 กิโลดาลตัน ซึ่งการที่พบสองแบนด์คาดว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการ glycosylation ของเซลล์ (2,4,16,20) จากผลการทำ Western blot สรุปได้ว่า HEK293 และ CHO-K1 ไม่สามารถแสดงออกพลาสมิดเวคเตอร์ pCMV ได้ แต่ยังไม่สามารถสรุปผลได้ว่า CHO-K1 ไม่สามารถแสดงออกโปรตีนทั้ง 4 ชนิดได้เนื่องจากไม่ทราบว่า CHO-K1 ได้รับพลาสมิดเข้าไปจากวิธีการนำเข้าพลาสมิดนี้หรือไม่ จากการทำการทดลองซ้ำอีกครั้ง โดยมีพลาสมิด pMAX GFP เป็น marker เพื่อติดตามการเข้าเซลล์ ผลที่ได้คือเซลล์ CHO-K1 สามารถนำพลาสมิดเข้าเซลล์ไปโดยวิธีนี้ได้แต่ไม่สามารถแสดงออกโปรตีนจากพลาสมิดทั้ 4 ชนิดได้ และอีกประเด็นคือแอนติบอดีปฐมภูมิที่เลือกใช้ในการตรวจหาโปรตีนจากพลาสมิด pCMV ไม่มี positive control จึงทำให้ไม่ทราบว่าแอนติบอดีสามารถจับกับโปรตีนจากพลาสมิด pCMV ได้จริงหรือไม่ การทดลองต่อๆไปจึงเลือกเซลล์ HEK293 และพลาสมิดเวคเตอร์ pCI neo ทำการทดลองต่อไป

จากการทดลองนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบบชั่วคราวจึงนำพลาสมิด pCI neo stabilized spike และ pCI neo RBD มานำเข้าสู่เซลล์ HEK293 แบบถาวรโดยหลักการเหมือนการทดลองก่อนหน้าแต่เพิ่มขั้นตอนคัดเลือกเซลล์ให้เซลล์เหลือเพียงที่มีพลาสมิดของเรา โดยเลือกยา G418 (neomycin) เพราะในพลาสมิดเวคเตอร์ pCI neo มียีนต้านยา neomycin (1) และใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งความเข้มข้นที่เลือกใช้ เลือกจากการทำการทดลอง optimization of G418 dose เลือกจากความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถฆ่าเซลล์ HEK293 ได้ทั้งหมด ผลคือใช้ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเซลล์ HEK293 ที่มียา G418 ผ่านไปเป็นเวลา 7 วัน พบว่าปริมาณเซลล์เริ่มลดลงและเซลล์ HEK293 โตช้าขึ้นในระหว่างนั้นเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกครั้งก่อนการ trypsinize เซลล์เพื่อย้ายหลุม เพื่อนำไปตรวจการแสดงออกโปรตีนด้วย Western blotผลปรากฏว่าเซลล์ HEK293 ที่ผ่านการคัดเลือกด้วยยา G418 จะไม่สามารถแสดงออกโปรตีนออกมาได้ถ้าผ่านการ trypsinize และถ้าไม่ trypsinize สามารถเก็บ

อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีโปรตีนที่แสดงออกจากพลาสมิดได้สูงสุด 4 วันหลังการนำเข้าพลาสมิด ด้วยเหตุนี้จึงไม่สามารถทำให้เซลล์ HEK293 เป็น stable cell line ที่สามารถแสดงออกโปรตีนของเราได้ซึ่งสาเหตุการที่เซลล์ HEK293 สูญเสียความสามารถในการแสดงออกโปรตีนอาจเป็นเพราะเกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเลี้ยงเซลล์ที่มียา G418 ในความเข้มข้นดังกล่าว

เนื่องจากไม่สามารถทำให้ HEK293 เป็น stable cell line ได้ จึงต้องหาวิธีที่จะผลิตโปรตีนจากการนำเข้าพลาสมิดแบบชั่วคราวได้โดยลดต้นทุนในการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ จึงเลือกใช้วิธี Calcium phosphate-mediated transfection ซึ่งเป็นวิธีที่ต้นทุนต่ำสามารถนำเข้าพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ปริมาณมากได้แต่มีข้อเสียคือการจับกับของเกลือทำให้เป็นพิษต่อเซลล์ต้องเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์หลังการนำเข้าพลาสมิดและถึงแม้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ก็ไม่สามารถกำจัดเกลือไปได้หมด (10) เมื่อทดลองนำเข้าพลาสมิดโดยมี pMAX GFP เป็น marker พบว่าสามารถใช้วิธีนี้ในการนำเข้าพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ HEK293 ได้ และเมื่อนำไปทดสอบการแสดงออกของโปรตีนโดยวิธี Western blot ก็พบแบนด์โปรตีนที่ต้องการเช่นกัน จึงทำการผลิตโปรตีนจากวิธีการดังกล่าวและเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์แต่ละหลุมวันที่ 4 หลังจากการนำเข้าพลาสมิดและเก็บไว้ที่ตู้ -20°c

เมื่อสามารถผลิตโปรตีนออกมาได้ระดับนึงและนำไปผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ (purification) ด้วยวิธี affinity column chromatography โดยแยกการทำเป็นสองครั้งเนื่องจากมีโปรตีนสองชนิด ผลจากการทำครั้งแรกซึ่งใช้โปรตีน spike ผลที่ได้คือ พบแบนด์โปรตีน spike จากการทำ Western blot อย่างชัดเจน ต่างจากการทำ SDS-PAGE ด้วยตัวอย่างเดียวกันซึ่งแสดงถึงความเข้มข้นที่ไม่มากพอของโปรตีน เพราะวิธี Western blot มีความจำเพาะและความไวสูงกว่าวิธี SDS-PAGE แม้มีปริมาณโปรตีนเพียงนิดเดียวสามารถตรวจพบได้ (11,15) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวอาจเกิดจากการใช้ปริมาณ imidazole ในการ elution ที่ไม่เหมาะสม เนื่องจากพบปริมาณโปรตีนบางส่วนใน flow through ในการ purification ครั้งต่อมาของโปรตีน RBD จึงเปลี่ยนปริมาณ imidazole จาก 500 mM เป็น 250 mM (5) ผลปรากฏว่าเมื่อนำโปรตีนมาทดสอบด้วยวิธี Western blot และ SDS-PAGE สามารถพบแบนด์โปรตีนได้ชัดเจนและ ไม่พบโปรตีนในส่วนของ flow through แต่เมื่อเทียบความบริสุทธิ์กับการ purification ครั้งแรกของโปรตีน spike พบว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนอื่นมากกว่า จึงนำโปรตีน RBD ไปทำ dialysis เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนอื่นๆ ส่วนโปรตีน spike นำไปทำ Ultrafiltration เพื่อลดปริมาตรเพิ่มความเข้มข้นให้มากขึ้น

เนื่องจากสถานการณ์การแพร่ระบาดของโรคโควิด-19 ทำให้ไม่สามารถทำการทดลองต่อในส่วนของการทดสอบ Binding activity ของโปรตีนที่ผลิตขึ้นกับแอนติบอดีจากเซรั่มผู้ป่วยโควิดหรือผู้ที่ได้รับวัคซีนได้ ซึ่งผลการทดลองที่คาดว่าจะเป็นคือ โปรตีนที่ผลิตขึ้นทั้ง Spike และ RBD สามารถจับกับแอนติบอดีจากเซรั่มมนุษย์ได้ โดยทำการทดลอง ELISA หรือ Wetern blot เพื่อเป็นการตรวจสอบ activity นี้ เมื่อทราบ activity ในการจับกับแอนติบอดีของมนุษย์แล้วจึงสามารถนำไปทำชุดตรวจวินิจฉัยได้ ยกตัวอย่าง เช่น การทำ rapid test kit ที่นำโปรตีนหนามของไวรัส coat ไว้บนเมมเบรนด์ เมื่อนำเซรั่มตัวอย่างที่มีแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสก็สามารถแสดงผลเป็นขีดสีขึ้นมาได้ เป็นต้น (13)

อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดของงานวิจัยคือ การทดลองนี้ทดลองกับเซลล์ 2 ชนิดคือ HEK2293 และ CHO-K1 ซึ่งการเลือกใช้เซลล์อื่นๆ อาจให้ผลผลิตโปรตีนที่มากกว่า หรืออาจทำให้เป็น stable cell line ได้ รวมทั้งการเปลี่ยนสเกลในการเลี้ยงเซลล์ให้มีขนาดใหญ่ขึ้นอาจได้ผลการทดลองที่ต่างกันออกไป (6) หรือการเปลี่ยนปริมาณ imidazole ที่ใช้ในการ purification อาจมีปริมาณที่เหมาะสมกว่าและสามารถทำให้ดปรตีนมีความบริสุทธิ์มากกว่าการทดลองดังกล่าว (5) ดังนั้นการทดลองเพิ่มเติมเพื่อศึกษาปัจจัยต่างๆที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตโปรตีนหรือในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์จะนำไปสู่การผลิตโปรตีนที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นเพื่อใช้พัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโควิด-19 ต่อไป

ภาคผนวก

1. อาหารเลี้ยงเซลล์ 10% FBS DMEM (ทั้งหมด 40 มิลลิลิตร)

DMEM	35.2	ml
Featal Bovine Serum (FBS)	4	ml
Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid (HEPES)	0.4	ml
Sodium pyruvate	0.4	ml

2. อาหารเลี้ยงเซลล์ 10% FBS F-12K (ทั้งหมด 40 มิลลิลิตร)

F-12K	36	ml
Featal Bovine Serum (FBS)	4	ml

3. Phosphate buffer sarine (PBS: ความเป็นกรดด่าง 7.4)

NaCl	8	g
KCl	0.2	g
Na_2HPO_4	3.63	g
KH_2PO_4	0.24	g
น้ำกลั่น	1	L

4. Acrylamide separating gel 8% (8 ml)

MilliQ water	3.836	ml
40% acrylamide	2	ml
1.5M Tris-HCl pH 8.8	2	ml
10% SDS	0.08	ml
10% APS	0.08	ml

TEMED (ใส่ท้ายสุด)	0.004	ml

5. Acrylamide separating gel 15% (8ml)

MilliQ water	2.836	ml
40% acrylamide	3	ml
1.5M Tris-HCl pH 8.8	2	ml
10% SDS	0.08	ml
10% APS	0.08	ml
TEMED (ใส่ท้ายสุด)	0.004	ml

6. Acrylamide stacking gel 5% (4 ml)

MilliQ water	2.408	ml
40% acrylamide	0.5	ml
1.5M Tris-HCl pH 8.8	1.008	ml
10% SDS	0.04	ml
10% APS	0.04	ml
TEMED (ใส่ท้ายสุด)	0.004	ml

7. Enhanced chemiluminescence (ECL) substrate

Tris-HCl pH8.5	5	ml
Luminol	25	ul
Coumaric acid	11	ul
H_2O_2	1.5	ul

8. Binding buffer pH7.4

20mM Sodium phosphate from stock 1 M

0.5M NaCl from stock 5 M

40mM imidazole from stock 1.5 M

น้ำกลั่น ปริมาตรตามโปรตีนที่จะทำการ purification

9. Elution buffer pH7.4

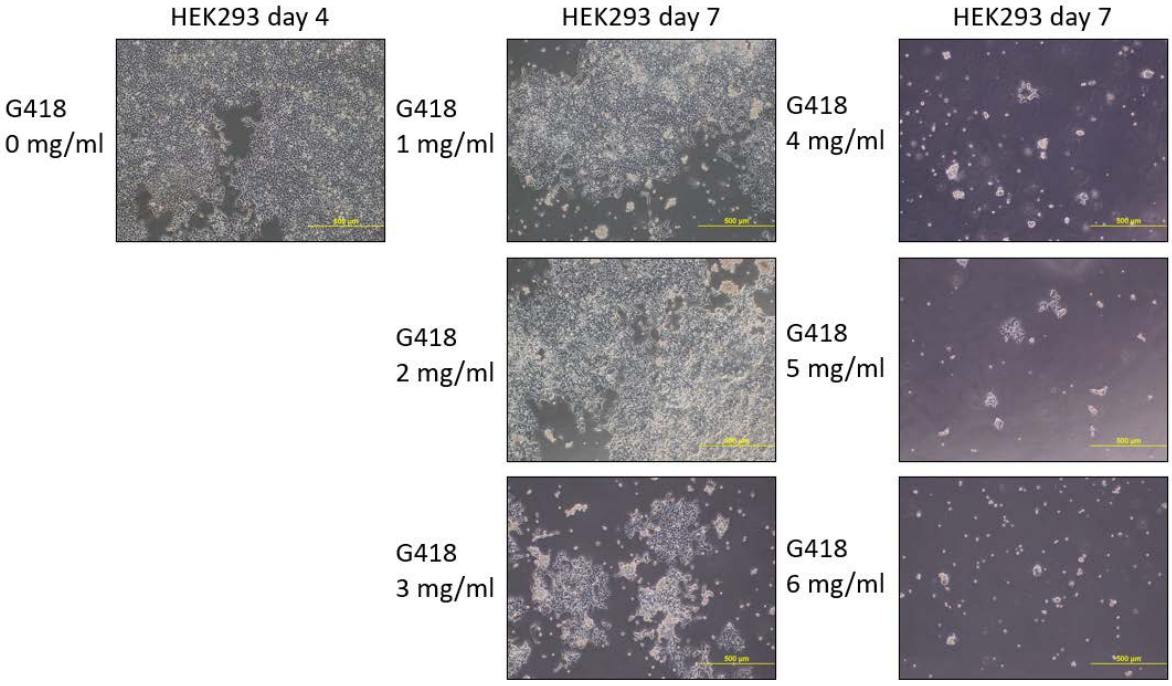
20mM Sodium phosphate from stock 1 M

0.5M NaCl from stock 5 M

500mM imidazole from stock 1.5 M (ความเข้มข้นขึ้นกับชนิดโปรตีน)

น้ำกลั่น 50 ml

10. ผลการทำการทดลองย่อย Optimization of G418 dose



ภาพที่ 4.1 การทดสอบปริมาณยา G418 ที่สามารถฆ่าเซลล์ HEK293 ได้

เอกสารอ้างอิง

1. Addgene. Plasmid: pCI-neo n.d. [Available from: https://www.addgene.org/vector-database/2184/]
2. RayBiotech. Recombinant SARS-CoV-2,S1 subunit protein (RBD) n.d. [Available from: https://www.raybiotech.com/recombinant-sars-cov-2-s1-subunit-protein-rbd/?fbclid=IwAR2YkQ5qcbRRwxG0tWyxGR3_m1tXFmhqbGmtD5YD2wqhmRFnwpAXpUbbiZY]
3. WHO. Coronavirus (COVID-19) n.d. [Available from: https://covid19.who.int/]
4. Antonopoulos, A., et al. (2021). "Site-specific characterization of SARS-CoV-2 spike glycoprotein receptor-binding domain." Glycobiology **31**(3): 181-187.
5. Arora, S., et al. (2017). "Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification." Methods **116**: 84-94.
6. Faravelli, S., et al. (2021). "Optimized Recombinant Production of Secreted Proteins Using Human Embryonic Kidney (HEK293) Cells Grown in Suspension." Bio-protocol **11**(8): e3998-e3998.
7. Gauger, P. C. and A. L. Vincent (2014). Serum virus neutralization assay for detection and quantitation of serum-neutralizing antibodies to influenza A virus in swine. Animal influenza virus, Springer**:** 313-324.
8. Grifoni, A., et al. (2020). "Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals." Cell **181**(7): 1489-1501. e1415.
9. Grubaugh, N. D., et al. (2020). "Making sense of mutation: what D614G means for the COVID-19 pandemic remains unclear." Cell **182**(4): 794-795.
10. Guo, L., et al. (2017). "Optimizing conditions for calcium phosphate mediated transient transfection." Saudi journal of biological sciences **24**(3): 622-629.
11. Hirano, S. (2012). Western blot analysis. Nanotoxicity, Springer**:** 87-97.

12. Khan, M., et al. (2021). "COVID-19: A Global Challenge with Old History, Epidemiology and Progress So Far." Molecules **26**(1): 39.

13. Li, H., et al. (2020). "A new and rapid approach for detecting COVID-19 based on S1 protein fragments." Clinical and translational medicine **10**(2): e90.

14. Lu, L., et al. (2020). "Antibody response and therapy in COVID-19 patients: what can be learned for vaccine development?" Science China Life Sciences: 1-17.

15. Pavlova, A. S., et al. (2018). "SDS-PAGE procedure: Application for characterization of new entirely uncharged nucleic acids analogs." Electrophoresis **39**(4): 670-674.

16. Sanyal, D., et al. (2020). "An exploration of the SARS-CoV-2 spike receptor binding domain (RBD), a complex palette of evolutionary and structural features." bioRxiv.

17. Scialo, F., et al. (2020). "ACE2: the major cell entry receptor for SARS-CoV-2." Lung: 1-11.

18. Scopes, R. (1995). “Overview of protein purification and characterization.” Current protocols in protein science(1): 1.1. 1-1.1. 6.

19. Walls, A. C., et al. (2020). "Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein." Cell **181**(2): 281-292. e286.

20. Wang, M.-Y., et al. (2020). "SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development." Frontiers in cellular and infection microbiology **10**.

21. Zitek, T. (2020). "The appropriate use of testing for COVID-19." Western Journal of Emergency Medicine **21**(3): 470.