

โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน VP1 ของไวรัสโกลีตจางในไก่ และการระบุเอพิโทป



นายเอกราช สิทธิเดช

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST VP1 PROTEIN OF CHICKEN ANEMIA VIRUS
AND EPITOPE MAPPING

Mr. Akekarach Sittidech



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Microbiology and Microbial

Technology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน VP1 ของไวรัสโหด
	จางในไก่ และการระบุเอพิโทป
โดย	นายเอกราช สิริเดช
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัครลาภสกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. พลฤกษ์ แสนวงษ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัครลาภสกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาติณี สิริศรัทธา)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. นลวัฒน์ บุญญาลัย)

เอกราช สิทธิเดช : โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน VP1 ของไวรัสโลหิตจางในไก่ และการระบุเอพิโทป (MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST VP1 PROTEIN OF CHICKEN ANEMIA VIRUS AND EPITOPE MAPPING) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. วันชัย อัครลาภสกุล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. นันทิกา คงเจริญพร, 79 หน้า.

โรคโลหิตจางในไก่ เกิดจากไวรัส Chicken anemia virus (CAV) ไก่ที่ติดไวรัส จะมีภาวะโลหิตจางอย่างรุนแรงตัวแคระแกร็น ต่อมัยมีสฟ่อ เซลล์ไขกระดูกลดลง และภูมิคุ้มกันบกพร่อง โปรตีน VP1 เป็นโปรตีนโครงสร้างของไวรัส ทำหน้าที่ในการรวมกันเป็นอนุภาคไวรัส มีคุณสมบัติในการเป็นแอนติเจน CAV งานวิจัยก่อนหน้านี้อาจสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ของไวรัสโลหิตจางในไก่ จึงเป็นที่มาของวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน VP1 และ ระบุเอพิโทปต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี โดยนำม้ามที่ได้จากการใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ กระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูเม้าส์ มาหลอมรวมกับเซลล์ไมอีโลมา พบว่าได้ เซลล์ไฮบริโดมาที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำนวน 5 โคลน ได้แก่ โคลนที่ 1, 2, 3, 7 และ 21 สามารถจำแนกชนิดของแอนติบอดีได้เป็น IgG2_a, IgM, IgG2_b, IgM และ IgG1 ตามลำดับ การระบุเอพิโทป ทำโดยแบ่งชิ้นส่วนสารพันธุกรรม $\Delta 60N_VP1$ เป็น 6 ส่วน ได้แก่ Fragment 1(F1), F2, F3, F4 และ Separating 1(S1) และ S2 ซึ่งแยกมาจากชิ้น F1 จากนั้นเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรมเมอร์จำเพาะ และทำการย้ายชิ้นส่วนแต่ละชิ้นเข้าสู่เวกเตอร์ pET28a นำไปชักนำให้เกิดการแสดงออกใน *E. coli* Rosetta-gami รีคอมบิแนนท์โปรตีนแต่ละชนิดจะถูกใช้เป็นแอนติเจนเพื่อใช้ระบุเอพิโทปต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยวิธี western blotting analysis ผลการทดลองพบโมโนโคลนอลแอนติบอดี ทั้ง 5 โคลน มีความจำเพาะต่อแอนติเจน $\Delta 60N_VP1$ และ ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มี His-Tag ชนิดอื่น ในการศึกษาที่ใช้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด IgG เท่านั้น ที่จะถูกนำไประบุเอพิโทป ผลการทดลองพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 1 ทำปฏิกิริยาจำเพาะกับโปรตีน F1 และโปรตีน S2 ในขณะที่โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 3 และ 21 สามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะกับโปรตีน F2 เท่านั้น ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 1, 3 และ 21 จึงเหมาะต่อการนำไปใช้พัฒนาชุดตรวจสอบ สำหรับวินิจฉัยหาไวรัส CAV ต่อไปในอนาคต

ภาควิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ปีการศึกษา	2560	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5772268823 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY

KEYWORDS: CHICKEN ANEMIA VIRUS / VP1 / MONOCLONAL ANTIBODIES

AKEKARACH SITTIDECH: MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST VP1 PROTEIN OF CHICKEN ANEMIA VIRUS AND EPITOPE MAPPING. ADVISOR: ASSOC. PROF. WANCHAI ASSAVALAPSAKUL, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. NANTHIKA KHONGCHAREONPORN, Ph.D., 79 pp.

Anemia disease in chickens is caused by Chicken Anemia Virus (CAV). The major clinical symptoms include anemia, hemorrhage, atrophy of the thymus and bone marrow and immunosuppression. VP1, the structural protein of CAV, is responsible for viral assembly and acts as immunogen. The previous study has already constructed and expressed the recombinant $\Delta 60N_VP1$ of CAV. Thus, the objectives of this work are to produce monoclonal antibodies (MAb) against VP1 protein and identify their potential epitopes. Splenocytes of BALB/c mice immunized with $\Delta 60N_VP1$ antigen were fused with myeloma cells. Five hybridoma clones, No.1, 2, 3, 7 and 21 were obtained and the type of MAb was subsequently identified as IgG_{2a}, IgM, IgG_{2b}, IgM, IgG₁ respectively. To identify the epitopes, the $\Delta 60N_VP1$ gene was divided into six fragments, including Fragment 1(F1), F2, F3, F4 and two separating parts of F1 (S1 and S2). PCR amplification of all segments were conducted with specific primers. The PCR fragments were cloned into pET28a vector for expression in *E. coli* Rosetta-gami. Each recombinant protein was used as an antigen to identify an epitope of MAb by western blotting analysis. The results showed that all five anti-VP1 monoclonal antibodies did not cross-react with His-tag region on recombinant protein. In the study, only IgG type was selected for epitope identification. The results showed MAb clone 1 could react with F1 and S2 proteins, while MAb clone 3 and 21 bind only with F2 protein. Therefore, MAb clone 1, 3 and 21 are promising to develop as a detection kit for diagnosis of CAV in the future.

Department: Microbiology Student's Signature

Field of Study: Microbiology and Advisor's Signature

Microbial Technology Co-Advisor's Signature

Academic Year: 2017

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลือของ รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัครลาภสกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงที่คอยชี้แนะให้คำปรึกษาและสนับสนุน รวมถึงคอยสอนเทคนิคต่างๆ มาโดยตลอดจนงานวิจัยและวิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทิกา คงเจริญพร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยดูแลชี้แนะ และคอยสอนเทคนิคต่างๆ ในด้าน cell culture และการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาติถิ สิริศรัทธา ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งช่วยแนะนำ และแสดงความคิดเห็น จนทำให้งานวิทยานิพนธ์นี้มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. นลวัฒน์ บุญญาลัย (ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก) กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รวมถึงช่วยให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้

ขอบคุณ นางสาวศรุตดา หวังอนุรักษกุล ที่อนุเคราะห์รีคอมบิแนนท์พลาสมิด $\Delta 60N_VP1$ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ขอบคุณ พี่ๆ ในห้องปฏิบัติการ 2014 ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และพี่ๆ สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและพันธุวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยแนะนำเทคนิคในการทำงานวิจัย จนสำเร็จไปได้ด้วยดี

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่คอยสนับสนุนด้านการศึกษา และให้กำลังใจเสมอมา

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจาก ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภชน์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 ปรีทรรศน์วรรณกรรม.....	3
บทที่ 3 วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	20
3.1 จุลินทรีย์และสัต์ว์ทดลอง.....	20
3.2 เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme).....	20
3.3 ไพรมเมอร์ (Primers).....	21
3.4 เวกเตอร์ (Vector).....	23
3.5 วัสดุและสารเคมี.....	25
บทที่ 4 วิธีดำเนินการทดลอง.....	26
4.1 ศึกษาการตอบสนองของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี	26
4.1.1 ทรานส์ฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิด $\Delta 60N_VP1$	26
4.1.2 ชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน.....	26
4.1.3 วิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting analysis.....	27
4.1.3.1 วิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE.....	27
4.1.3.2 ติดตามการแสดงออกด้วยวิธี Western blotting analysis.....	28
4.1.3.2A ถ่ายโอนโปรตีนจากเจลลงบนแผ่นเมมเบรน.....	28

4.1.3.2B Chemiluminescence และ autoradiography.....	29
4.2 ทำรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ให้บริสุทธิ์	30
4.2.1 ขยายขนาดการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน	30
4.2.2 เตรียมสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$	30
4.2.3 ทำรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ให้บริสุทธิ์	30
4.2.4 ตกตะกอนโปรตีนด้วย Trichloro-acetic acid (TCA).....	31
4.2.5 กำจัดสาร Sakosyl และ Imidazole ออกด้วยวิธี Dialysis	31
4.2.6 วัดความเข้มข้นของโปรตีนบริสุทธิ์ด้วยวิธี Bradford assay.....	31
4.3 นำสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	32
4.3.1 เตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นการผลิตแอนติบอดี.....	32
4.3.2 ฉีดกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง.....	32
4.3.3 ติดตามการผลิตแอนติบอดีโดยวิธี Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Indirect-ELISA).....	32
4.3.4 ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน $\Delta 60N_VP1$	33
4.3.4.1 เตรียมเซลล์ไมอีโลมา (Myeloma cell).....	33
4.3.4.2 เตรียมเซลล์ม้าม (Spleen cell).....	33
4.3.4.3 หลอมรวมเซลล์ (Cell fusion).....	33
4.3.5 หาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Isotype test).....	34
4.3.6 ทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Sensitivity test).....	34
4.3.7 ทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โปรตีนจี	34
4.3.8 วัดความเข้มข้นของแอนติบอดีบริสุทธิ์ด้วยวิธี BCA protein assay.....	35
4.4 ระบุเอพิโทปที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี	36
4.4.1 สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a- $\Delta 60N_VP1$ ด้วยวิธี CTAB.....	36

4.4.2	ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พหุริเมอเรส.....	36
4.4.2.1	เพิ่มจำนวนชิ้นส่วน Fragment 1 ถึง Fragment 4 (F1-F4).....	36
4.4.2.2	เพิ่มจำนวนชิ้นส่วน Separating 1 และ Separating 2 (S1-S2).....	37
4.4.2.3	ทำชิ้นส่วนดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วย Gel Extraction Kit (QIAGEN).....	38
4.4.3	เชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์.....	38
4.4.3.1	เชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้ากับ pJET 1.2 blunt Cloning Vector	38
4.4.3.2	เชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้ากับ pET28a (+) vector	39
4.4.4	ระบุเอพิโทปต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี	39
บทที่ 5	ผลการทดลอง	40
5.1	ผลการชักนำการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$	40
5.2	ผลการทำรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ให้บริสุทธิ์.....	41
5.3	ผลวัดความเข้มข้นของโปรตีนบริสุทธิ์โดยวิธี Bradford assay.....	42
5.4	ผลการหาความเข้มข้นของแอนติเจนที่เหมาะสมต่อการหาโมโนโคลนอลแอนติบอดี	43
5.5	ผลการประยุกต์ใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ สำหรับผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	43
5.6	ผลการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โปรตีนจี	46
5.7	ผลการวัดความเข้มข้นของแอนติบอดีบริสุทธิ์โดยวิธี BCA.....	48
5.8	ผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พหุริเมอเรส (PCR) ชิ้นส่วน Fragment 1- Fragment 4 (F1-F4)..	49
5.9	ผลการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pJET- (F1-F4).....	50
5.10	ผลการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a- (F1-F4).....	53
5.11	ผลการระบุเอพิโทปต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	56
5.12	ผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พหุริเมอเรส ชิ้นส่วน Separating 1- Separating 2 (S1, S2).....	60
5.13	ผลการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pJET- S1 และ S2.....	61

5.14 ผลการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a- S1 และ S2	62
5.15 ผลการระบุเอพิโทปต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	63
บทที่ 6 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	64
รายการอ้างอิง	67
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	79



สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1	คุณสมบัติของอิมมูโนโกลบูลิน Class และ Subclass	12
ตารางที่ 2.2	องค์ประกอบของโปรตีนสายยาวและสายสั้น ของ Ig ไอโซไทป์ต่างๆ.....	14
ตารางที่ 2.3	ข้อดีและข้อจำกัดระหว่างโพลีโคลนอลแอนติบอดี และโมโนโคลนอลแอนติบอดี.....	15
ตารางที่ 2.4	โครโมจีนิกสับสเตรทสำหรับ Horseradish peroxidase (HRP)	18
ตารางที่ 3.1	จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย	20
ตารางที่ 3.2	สัตว์ทดลองที่ใช้ในงานวิจัย.....	20
ตารางที่ 3.3	เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในงานวิจัย.....	20
ตารางที่ 3.4	ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย	21
ตารางที่ 3.5	ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	22
ตารางที่ 3.6	วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	25
ตารางที่ 4.1	เตรียมเจลสำหรับวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Glycine-SDS-PAGE	27
ตารางที่ 4.2	เตรียมเจลสำหรับวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Tricine-SDS-PAGE	28
ตารางที่ 4.3	โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของชิ้นส่วน F1-F4 และ S1 และ S2... 37	
ตารางที่ 5.1	แสดงผลการวัดความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีน Δ 60N_VP1 บริสุทธิ์ ด้วยวิธี Bradford assay.....	42
ตารางที่ 5.2	แสดงผลการหาโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจน Δ 60N_VP1	43
ตารางที่ 5.3	แสดงผลการหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้.....	44
ตารางที่ 5.4	แสดงความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีบริสุทธิ์ ด้วยวิธี BCA	48

สารบัญรูป

รูปที่ 2.1 เซลล์เป้าหมายสำหรับการเข้าติดเชื้อของไวรัส CAV	3
รูปที่ 2.2 โครงสร้างของไวรัสโลहितจางไนไก่.....	4
รูปที่ 2.3 ลักษณะการจัดเรียงจีโนมของไวรัสโลहितจางไนไก่.....	5
รูปที่ 2.4 แสดงจีโนมของไวรัส CAV แบ่งออกเป็น 3 ORFs.....	6
รูปที่ 2.5 โครงสร้างพื้นฐานของแอนติบอดี	10
รูปที่ 2.6 โครงสร้างทั่วไปของแอนติบอดีทั้ง 5 ไอโซไทป์.....	11
รูปที่ 2.7 วิธีสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของไมอีโลมาโดย De novo pathway และ Salvage pathway ดัดแปลงจากหนังสือเทคโนโลยีทางภูมิคุ้มกันวิทยา.....	16
รูปที่ 2.8 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในหนูทดลอง	17
รูปที่ 3.1 แผนภาพของ pJET1.2/blunt cloning vector	23
รูปที่ 3.2 แผนภาพของ pET-28a (+) vector.....	24
รูปที่ 4.1 แสดงดีเอ็นเอที่แบ่งจากชิ้นส่วนของ $\Delta 60N_VP1$ จำนวน 6 ชิ้น	37
รูปที่ 4.2 สูตรคำนวณเพื่อหาปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เหมาะสมต่อการเชื่อมเข้าสู่เวกเตอร์	38
รูปที่ 5.1 ผลการวิเคราะห์ด้วย 13% SDS-PAGE (A) Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His monoclonal antibody (B) โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (C) อัตราส่วน 1:5,000 ของรีคอมบิแนนท์โคลนถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง.....	40
รูปที่ 5.2 ผลการวิเคราะห์ด้วย 13% SDS-PAGE (A) Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His monoclonal antibody (B) ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์	41

รูปที่ 5.3	กราฟค่าความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลนที่ 1(แกนสีฟ้า) , โคลนที่ 3 และโคลนที่ (แกนสีส้ม) 21ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ (แกนสีเทา) การเจือจางของแอนติบอดี(แกน X) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (แกน Y).....	45
รูปที่ 5.4	กราฟแสดงผลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 1 ที่ทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งแสดง ความสัมพันธ์ระหว่าง fraction ที่ชะแอนติบอดีออกจากคอลัมน์ (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (แกน Y).....	46
รูปที่ 5.5	ผลการวิเคราะห์ด้วย 13% SDS-PAGE ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 1 ที่ทำให้ บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โปรตีนจี แต่ละเลนมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร.....	47
รูปที่ 5.6	ผลการวิเคราะห์ด้วย 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลา 60 นาที.....	49
รูปที่ 5.7	ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Fragment 1 ที่ เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pJET1.2 blunt cloning kit เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโน ของโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (ควบคุม)	50
รูปที่ 5.8	ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Fragment 2 ที่ เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pJET1.2 blunt cloning kit เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโน ของโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (ควบคุม)	51
รูปที่ 5.9	ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Fragment 3 ที่ เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pJET1.2 blunt cloning kit เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโน ของโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (ควบคุม)	51
รูปที่ 5.10	ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Fragment 4 ที่ เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pJET1.2 blunt cloning kit เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโน ของโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (ควบคุม)	52
รูปที่ 5.11	ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Fragment 1 ที่ เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pET28a เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (ควบคุม)	53
รูปที่ 5.12	ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Fragment 2 ที่ เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pET28a เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (ควบคุม)	54

- รูปที่ 5.13 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Fragment 3 ที่เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pET28a เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (ควบคุม) 54
- รูปที่ 5.14 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Fragment 4 ที่เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pET28a เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (ควบคุม) 55
- รูปที่ 5.15 ผลการวิเคราะห์ด้วย 13% SDS-PAGE (A) Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His monoclonal antibody (B) อัตราส่วน 1:2,500 ของรีคอมบิแนนท์โคลน ถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศา เป็นเวลา 3 ชั่วโมง Lane 1, 3, 5, 7, 9 เป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกและ Lane 2, 4, 6, 8, 10 เป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออก..... 56
- รูปที่ 5.16 ผลการวิเคราะห์ด้วย 13% SDS-PAGE (A) Western blotting analysis โดยใช้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 1 อัตราส่วน 1:5,000 (B) ของรีคอมบิแนนท์โคลน ถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศา เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดย Lane 1, 3, 5, 7, 9 เป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกและ Lane 2, 4, 6, 8, 10 เป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออก 57
- รูปที่ 5.17 ผลการวิเคราะห์ด้วย 18% Tricine gel SDS-PAGE (A) Western blotting analysis โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 3 (B) โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 21 (C) อัตราส่วน 1:5,000 ของรีคอมบิแนนท์โคลนที่ถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศา เป็นเวลา 3 ชั่วโมง .. 58
- รูปที่ 5.18 ผลการวิเคราะห์ด้วย 18% Tricine gel SDS-PAGE (A) Western blotting analysis โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 29 อัตราส่วน 1:500 (B) ของรีคอมบิแนนท์โคลน ที่ถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศา เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 59
- รูปที่ 5.19 ผลการวิเคราะห์ด้วย 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลา 60 นาที 60
- รูปที่ 5.20 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Separating 1 ที่เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pJET1.2 blunt cloning kit เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Fragment 1(ควบคุม) 61

รูปที่ 5.21 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Separating 2 ที่เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pJET1.2 blunt cloning kit เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Fragment 1(ควบคุม) 61

รูปที่ 5.22 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Separating 1 ที่เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pET28a (+) เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Fragment 1(ควบคุม) 62

รูปที่ 5.23 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Separating 2 ที่เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pET28a (+) เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Fragment 1(ควบคุม) 62

รูปที่ 5.24 ผลการวิเคราะห์ด้วย 18% Tricine gel SDS-PAGE (A) Western blotting analysis โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีก่อน (Pre) ทำให้บริสุทธิ์ (B) โมโนโคลนอลแอนติบอดีหลัง (Post) ทำให้บริสุทธิ์ (C) อัตราส่วน 1:5,000 63



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันอัตราการบริโภคผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสัตว์ปีกมีเพิ่มขึ้นตามจำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้อุตสาหกรรมการผลิตและการส่งออกผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสัตว์ปีกเติบโตและสร้างรายได้แก่ประเทศไทยเป็นจำนวนมาก สถาบันอาหารกระทรวงอุตสาหกรรม แสดงยอดการส่งออกผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีกจาก 339,680 ตัน (พ.ศ.2557) เพิ่มขึ้นเป็น 700,000 ตัน ในครั้งปีแรก (พ.ศ.2558) และคาดว่าจะมียอดการส่งออกสูงขึ้นในครั้งปีหลัง [1] อย่างไรก็ตาม การแพร่ระบาดของโรคในสัตว์ปีกสร้างความเสียหายเป็นอย่างมาก เช่น โรคไข้หวัดนก โรคนิวคาสเซิล โรคหลอดลมอักเสบติดต่อ และโรคโลหิตจางในไก่ เป็นต้น [2]

โรคโลหิตจางในไก่ (Chicken Infectious Anemia) เป็นโรคที่พบในสัตว์ปีก และแพร่ระบาดอย่างกว้างขวางในธรรมชาติ โรคโลหิตจางในไก่เกิดจาก Chicken Anemia Virus (CAV) จะแบ่งอาการเป็น 2 กลุ่ม คือ ไวรัสที่ติดเชื้อในไก่อายุไม่เกิน 3 สัปดาห์ มีอาการตัวแคระแกร็น ไชกระดูกอ่อน เซลล์ไขกระดูกลดลง ไวรัสเข้าติดเชื้อใน Hemocytoblast มีผลยับยั้งการผลิตเซลล์เม็ดเลือดแดง (Red Blood Cell) เซลล์เม็ดเลือดขาว (White Blood Cell) เกล็ดเลือด (Pellet) เกิดอาการตัวซีด เนื่องจากมีภาวะโลหิตจางอย่างรุนแรง และ CAV สามารถเพิ่มจำนวน และทำลายเซลล์เจ้าบ้านโดยทำให้เซลล์แตก (apoptosis) ไก่จะมีเลือดออกใต้ผิวหนัง เกิดเป็นจุดแดง และพบอัตราการตายสูงเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ [3-5] กลุ่มที่ 2 ไวรัสที่ติดเชื้อในไก่อายุมากกว่า 3 สัปดาห์ พบว่าไก่นี้มีน้ำหนักลดลง เซลล์เม็ดเลือดขาวลดลง Cytotoxic T lymphocytes (CTL) มีการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันลดลง ทำให้ T Lymphocyte ลดประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์แปลกปลอมหรือเซลล์เป้าหมาย เกิดภูมิคุ้มกันบกพร่องอย่างรุนแรง [4, 6] และเพิ่มโอกาสติดโรคแทรกซ้อนจากไวรัสแบคทีเรีย หรือราอื่นๆ ได้ นอกจากนี้ CAV สามารถแพร่ระบาดจากแม่สู่ลูก (Vertical transmission) และแพร่จากการหายใจ การกิน การสัมผัสในโรงเรือน (Horizontal transmission) ซึ่งเป็นการเพิ่มการแพร่ระบาดได้รวดเร็ว [7] ดังนั้น การตรวจสอบการติดเชื้อ และการควบคุมการแพร่ระบาดของไวรัสโลหิตจางในไก่ ถือเป็นเรื่องสำคัญ เพื่อป้องกันไม่ให้ไก่ตายเนื่องจากติดไวรัสดังกล่าว

งานวิจัยก่อนหน้านี้ [8] ได้สร้างรีคอมบิแนนท์โคลน $\Delta 60N_VP1$ ของไวรัสโลหิตจางในไก่ โดยอาศัยวิธีการทางพันธุวิศวกรรมในการผลิตรีคอมบิแนนท์ในแบคทีเรีย โดยงานวิจัยนี้จะใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ดังกล่าว มากระตุ้นการผลิตแอนติบอดีในหนูเม้าส์ และแอนติบอดีที่ผลิตได้จะถูกนำไปทดสอบความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specific) จำแนกคลาสของแอนติบอดี (isotype) และระบุเอพิโทป ในอนาคตจะสามารถนำแอนติบอดีที่ผลิตได้มาประยุกต์ใช้ในการตรวจติดตามไวรัสโลหิตจางในไก่ต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนVP1 ของไวรัสโกลีตจางในไก่และระบุเอพิโทปต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน VP1 ของไวรัสโกลีตจางในไก่
- 2) ทราบเอพิโทปบนโปรตีน VP1 ที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้



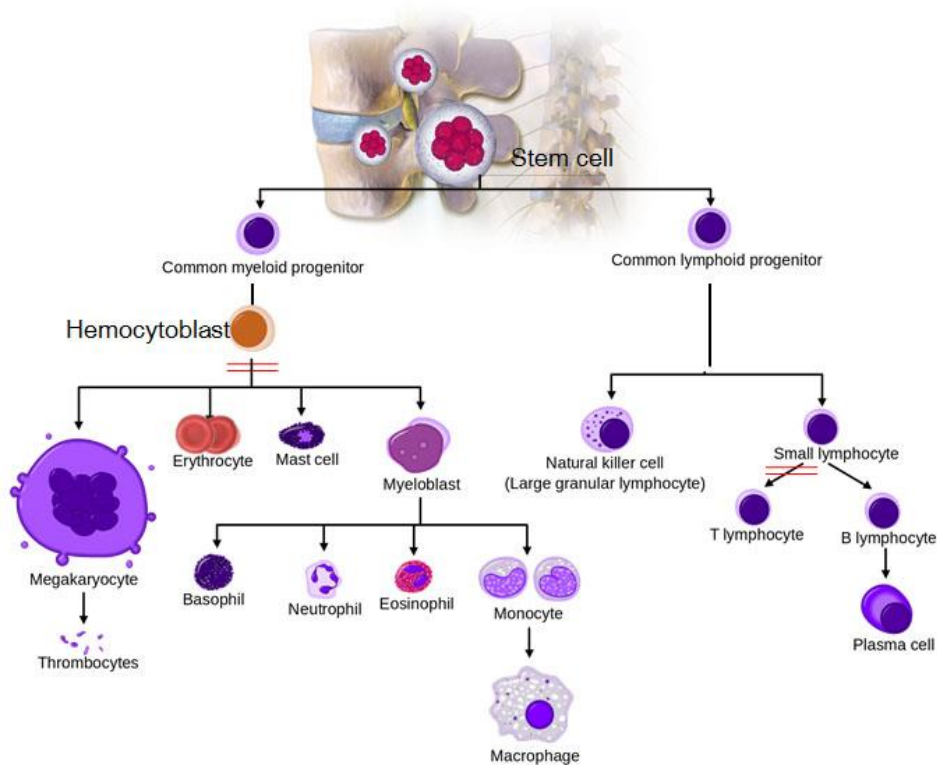
บทที่ 2 ปรีทรศน์วรรณกรรม

2.1 โรคโลหิตจางในไก่

โรคโลหิตจางในไก่ (Chicken Infectious Anemia) เป็นโรคที่พบในสัตว์ปีกโดยเฉพาะในไก่ เกิดจากไวรัส Chicken anemia virus (CAV) พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ถูกค้นพบในปี ค.ศ.1970 และได้มีการทดลองแยกเชื้อเพื่อศึกษาพยาธิสภาพของโรคในปี ค.ศ.1979 ในประเทศญี่ปุ่น [9]

2.2 การก่อโรค

ไวรัส CAV สามารถเข้าติดเชื้อในสัตว์ปีกได้ 2 บริเวณ ได้แก่ Hemocytoblast ซึ่งอยู่บริเวณไขกระดูกทำหน้าที่เป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่างๆ เช่น เซลล์เม็ดเลือดแดง (Red Blood Cell) และเซลล์เม็ดเลือดขาว (White Blood Cell) เป็นต้น และ T-lymphocyte precursor ซึ่งถูกผลิตจากต่อมธัยมัส และพัฒนาไปเป็น T cell [3, 6, 10, 11] รูปที่ 2.1



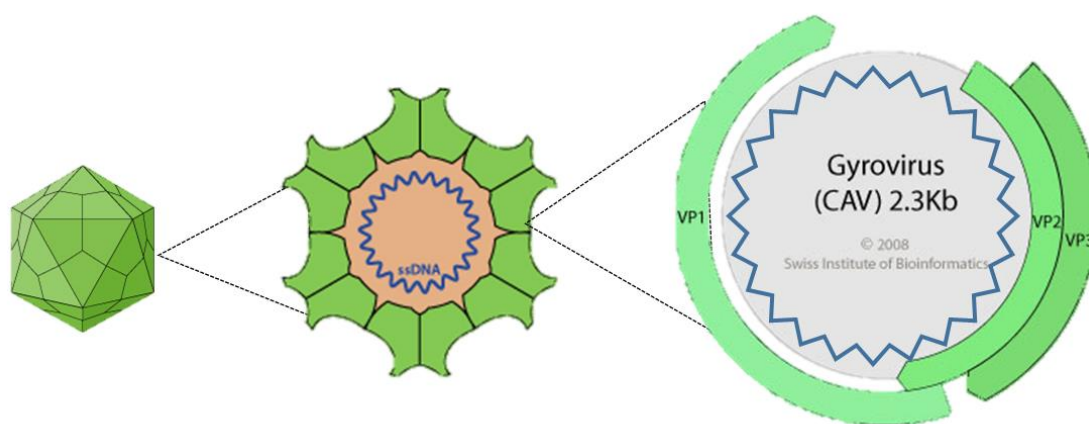
รูปที่ 2.1 เซลล์เป้าหมายสำหรับการเข้าติดเชื้อของไวรัส CAV [12]

2.3 อาการของโรค

อาการของโรค สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ ไวรัสที่ติดเชื้อในไก่อายุไม่เกิน 3 สัปดาห์ และไวรัสที่ติดเชื้อในไก่อายุมากกว่า 3 สัปดาห์ โดยไก่อายุไม่เกิน 3 สัปดาห์ เมื่อติดเชื้อจะมีลักษณะ ตัวแคระแกร็น ไช้กระดูกฝ่อ ทำให้เซลล์ไช้กระดูกลดลง นอกจากนี้ยังมีลักษณะตัวซีดเนื่องจาก Hemocytoblast หยุดการผลิตเซลล์เม็ดเลือดแดง เกิดภาวะโลหิตจางอย่างรุนแรง เมื่อไวรัส CAV เติบโตและเพิ่มจำนวนในเซลล์เจ้าบ้านแล้ว จะเหนี่ยวนำให้เซลล์เจ้าบ้านแตก (apoptosis) ทำให้มีเลือดออกบริเวณใต้ผิวหนัง สังเกตเห็นเป็นจุดแดงๆ และพบอัตราการตายสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ [3, 4, 11] ส่วนไก่อายุมากกว่า 3 สัปดาห์เมื่อติดเชื้อน้ำหนักร่างกายจะลดลง เนื่องจาก T-lymphocyte precursor เกิดการติดเชื้อ ทำให้ T cell ลดลง ไก่ที่ติดเชื้อจะมีการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน น้อยลง ทำให้ลดประสิทธิภาพในการเข้าทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย เกิดภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องอย่างรุนแรง และเพิ่มโอกาสในการรับเชื้ออวัยวะจากแบคทีเรีย รา หรือไวรัสอื่นได้ [4, 6]

2.4 ลักษณะโครงสร้างของไวรัส

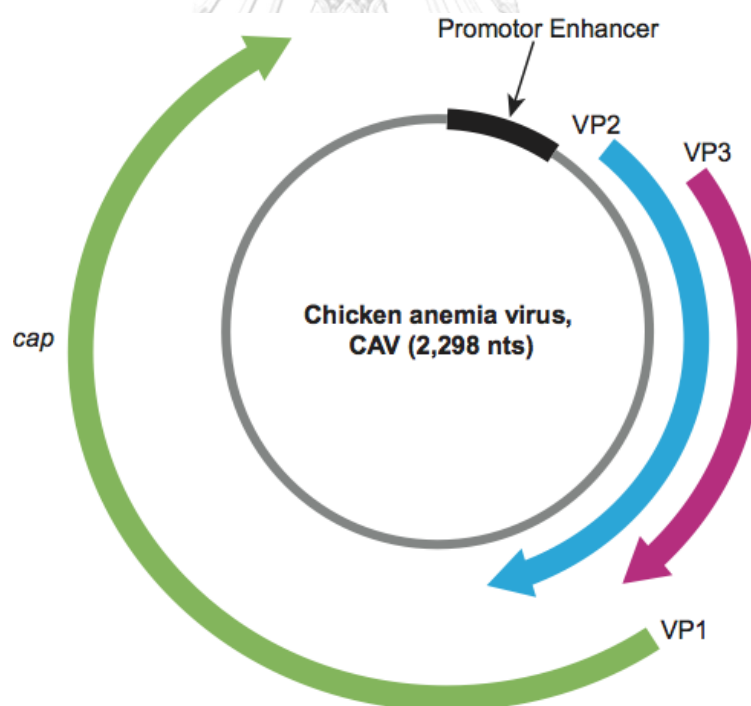
ไวรัสโลหิตจางในไก่จัดอยู่ในวงศ์ (Family) *Circoviridae* และจัดอยู่ในสกุล (Genus) *Gyrovirus* CAV เป็นไวรัสขนาดเล็กมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 25 นาโนเมตร ไม่มีเปลือกหุ้ม อนุภาคไวรัส (non-enveloped) มีโปรตีนแคพซิดรูปทรง Icosahedral symmetry [13] ประกอบด้วยโปรตีนแคพซิดจำนวน 60 หน่วย (T=1) อนุภาคไวรัสชนิดนี้ไม่มีคาร์โบไฮเดรตและไขมัน เป็นองค์ประกอบทำให้ทนต่อสารเคมีและสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ทำให้ไวรัสอยู่ในสภาวะที่ไม่สามารถก่อโรคได้ [14]



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของไวรัสโลหิตจางในไก่ [15]

2.5 ลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัส

CAV จัดอยู่ในวงศ์ (Family) *Circoviridae* และจัดอยู่ในสกุล (Genus) *Gyrovirus* ลักษณะทางพันธุกรรมของ CAV มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวประจุลบ ที่มีวนพับเป็นวงกลม (negative sense – circular single stranded DNA) ยาว 2.3 กิโลเบส ซึ่งแตกต่างจากไวรัสในสกุลเดียวกัน ที่มีลักษณะจีโนมเป็น ambience-circular single stranded DNA [13] จีโนมของไวรัสประกอบด้วย open reading frame (ORF) 3 ORF ได้แก่ ORF1, ORF2 และ ORF3 โดยที่ ORF1 จะอยู่บริเวณในสุดติดกับสารพันธุกรรมของไวรัส ถัดออกมาจะเป็น ORF2 มีขนาดเล็กที่สุด ซึ่งซ้อนทับอยู่บน ORF1 และสุดท้าย ORF3 เป็นบริเวณที่มีขนาดใหญ่ที่สุด มีส่วนต้นของ ORF3 ซ้อนทับอยู่ตรงปลาย ORF1 ซึ่งทั้ง 3 ORFs สามารถแปลและถอดรหัสได้เป็นโปรตีนทั้งหมด 3 ชนิด ประกอบไปด้วยโปรตีนที่ไม่เป็นโปรตีนโครงสร้าง (non-structural protein) 2 ชนิด ได้แก่ โปรตีน VP2 และโปรตีน VP3 นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) 1 ชนิด ได้แก่ โปรตีน VP1 [16] แสดงในรูปที่ 2.3 โดย ORF1 คือ โปรตีน VP2, ORF2 คือ โปรตีน VP3 และ ORF3 คือ โปรตีน VP1 ส่วนบริเวณ Promotor Enhancer เป็นบริเวณที่ไม่ถูกถอดรหัส (non-transcribed region; NTR) จะประกอบไปด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ 19 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นตำแหน่งในการเข้าจับกันของ Promotor Enhancer element เพื่อควบคุมกระบวนการถอดรหัสพันธุกรรม



รูปที่ 2.3 ลักษณะการจัดเรียงจีโนมของไวรัสโลหิตจางในไก่ [17]

2.6 โปรตีนที่สำคัญของไวรัสโกลด์จังในไก่

2.6.1 โปรตีน VP2 ถูกถอดรหัสมาจากยีน ORF1

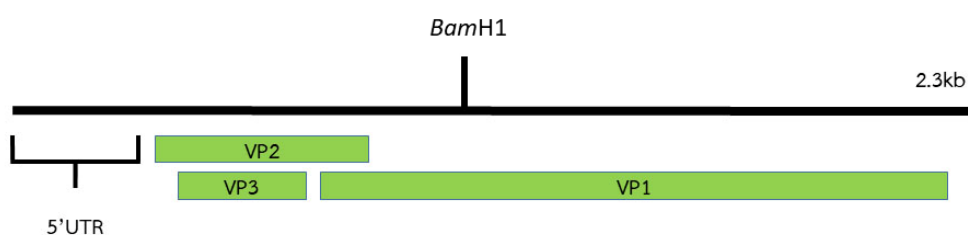
โปรตีน VP2 เป็นโปรตีนแบบ non-structural protein มีขนาดใหญ่เป็นอันดับสอง ขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตัน (kDa) มีบทบาทช่วยในการประกอบเอพิโทปให้มีความถูกต้อง และยังมีคุณสมบัติ dual specificity protein phosphatase (DSP) มีหน้าที่ในการควบคุมการเพิ่มจำนวนของไวรัส [7, 18-20]

2.6.2 โปรตีน VP3 ถูกถอดรหัสมาจากยีน ORF2

โปรตีน VP3 หรือโปรตีน apoptin เป็นโปรตีนแบบ non-structural protein เช่นเดียวกับโปรตีน VP2 มีขนาดเล็กที่สุดประมาณ 13 กิโลดาลตัน (kDa) โดยที่ปลาย C-terminal ของโปรตีนชนิดนี้มีกรดอะมิโน Proline, Serine, Arginine และ Threonine มีคุณสมบัติในการจับกับสารพันธุกรรมของเซลล์เจ้าบ้านได้ และทำลายโครงสร้างของโครโมโซม ทำให้ให้เซลล์เจ้าบ้านที่ติดเชื้อเกิดการ apoptosis ในเวลาต่อมา [19, 21]

2.6.3 โปรตีน VP1 ถูกถอดรหัสมาจากยีน ORF3

โปรตีน VP1 หรือ capsid protein เป็นโปรตีนเพียงชนิดเดียวที่เป็นแบบ structural protein มีขนาดใหญ่ที่สุด ขนาดประมาณ 52 กิโลดาลตัน (kDa) มีคุณสมบัติในการเป็นแอนติเจน (antigenicity) โดยปลาย N-terminal จะเป็นประจุบวกสูง เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีกรดอะมิโน Arginine อยู่มาก ทำให้จับกับสารพันธุกรรมของไวรัสเพื่อสร้างแคพซิดห่อหุ้มอนุภาคไวรัสได้ [22-24] ปลาย C-terminal ประกอบด้วย replication motif เกี่ยวข้องกับกระบวนการ Rolling cycle replication (RCR) มีบทบาทเกี่ยวกับการเพิ่มจำนวนของไวรัส CAV [25, 26]



รูปที่ 2.4 แสดงจีโนมของไวรัส CAV แบ่งออกเป็น 3 ORFs (เอกราช สิทธิเดช)

2.7 การแพร่ระบาด

ไวรัส CAV สามารถแพร่ระบาดได้ 2 รูปแบบคือ vertical transmission ไวรัสแพร่ผ่านการฟักไข่ของแม่ไก่และแพร่ผ่านน้ำเชื้อของพ่อไก่ที่ติดไวรัส [27] และแบบ horizontal transmission ซึ่งสามารถแพร่ผ่านกันได้ง่าย และรวดเร็วภายในโรงเลี้ยง ผ่านการหายใจ การสัมผัส หรืออุจจาระของไก่ที่ติดเชื้อ [7]

2.8 การกำจัดไวรัสโลหิตจาง

การกำจัดไวรัสโลหิตจางที่แพร่กระจายอยู่ในธรรมชาติมีหลากหลายวิธีเช่น ใช้ความร้อน 100°C นาน 15 นาที [28] 10% iodine หรือ 10% hypochlorite นาน 2 ชั่วโมง, 5% formaldehyde นาน 24 ชั่วโมง, 0.4% beta-propiolactone นาน 24 ชั่วโมง, 50% phenol นาน 5 นาที [9, 29]

2.9 การป้องกันการแพร่ระบาดของโรค

วัคซีนมี 2 ชนิด

2.9.1 วัคซีนเชื้อเป็น (Live attenuated vaccine)

คือ วัคซีนที่ถูกทำให้อ่อนกำลัง ไม่สามารถก่อโรคได้ ประเทศไทยได้นำเข้าวัคซีนเชื้อเป็นจากประเทศเยอรมัน โดยผสมกับน้ำสะอาดให้ไก่กิน และประเทศเนเธอร์แลนด์ วิธีใช้ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยตรงในแม่ไก่ ก่อนช่วงวางไข่ประมาณ 1 เดือน [30] วัคซีนชนิดนี้มีข้อเสียคือ ไวรัสอาจกลับมาก่อโรคได้ และทำให้ลูกไก่เกิดภูมิคุ้มกันบกพร่องแบบไม่แสดงอาการ [31, 32]

2.9.2 วัคซีนเชื้อตาย (Killed vaccine)

คือ วัคซีนที่ผลิตจากไวรัสที่ตายแล้ว ซึ่งไวรัสไม่สามารถกลับมาก่อโรคได้อีก แต่ยังคงมีข้อจำกัดในการผลิตให้ได้ในปริมาณที่เพียงพอ [22]

การให้วัคซีนป้องกันโรค CAV จะมีผลสัมฤทธิ์ได้นั้น ควรทำควบคู่กับการตรวจวินิจฉัยหารอยโรค ไม่ว่าจะเป็นการตรวจลักษณะไก่จากภายนอก หรือการตรวจระดับระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ผู้เลี้ยงควรหมั่นทำความสะอาดโรงเลี้ยง เปลี่ยนอาหาร และน้ำ ให้สะอาดอยู่เสมอ เพื่อป้องกันไม่ให้ไวรัสกลับมาระบาด [14, 22]

2.10 การตรวจวินิจฉัย

2.10.1 การตรวจหาไวรัสด้วยเทคนิค Immunofluorescence staining

เป็นหลักการที่อาศัยความจำเพาะระหว่างไวรัส CAV กับแอนติบอดีที่จำเพาะ ซึ่งสามารถทดสอบกับตัวอย่างอวัยวะ รวมถึงเซลล์เพาะเลี้ยงไวรัสโดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี หรือโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไวรัส CAV และใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วย FITC เป็นตัวติดตามผล จากนั้นนำไปอ่านผลผ่านกล้อง fluorescence [33, 34]

2.10.2 การตรวจหาไวรัสด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

ปัจจุบัน PCR เป็นวิธีตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสที่ได้รับความนิยมมาก เพราะสามารถนำตัวอย่างที่หลากหลายมาตรวจหาไวรัสได้ ไม่ว่าจะปั่นเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะที่ติดเชื้อ หรือเลือด เป็นต้น [35] โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัส วิธีนี้เป็นวิธีที่รวดเร็ว และให้ความจำเพาะสูง [36] นอกจากนี้ยังมีการใช้วิธี real time PCR, nested PCR ซึ่งตรวจติดตามปริมาณไวรัส และให้ความจำเพาะที่สูงกว่า PCR ทั่วไป [6, 37]

2.10.3 การตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสด้วยการใช้ซีรัม

การตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสมีหลายวิธีเช่น Immunofluorescence test (IF), Enzyme Linked Immunosorbent assay (ELISA) [38] แต่การตรวจหาแอนติบอดีจากซีรัมในไก่ที่ติดเชื้อยังคงมีข้อจำกัด คือ ในช่วง 2 สัปดาห์แรกไก่ที่ติดเชื้ออาจยังไม่ผลิตแอนติบอดี หรือผลิตในปริมาณที่น้อย ขึ้นอยู่กับปริมาณไวรัสที่รับเข้าไป จึงต้องอาศัยวิธีอื่นๆ ในการตรวจร่วมด้วย อย่างไรก็ตามการ screening นิยมใช้วิธี ELISA เพราะเป็นวิธีที่เร็ว ให้ความจำเพาะสูง มีความไวสูง ง่ายต่อการตรวจหา และอาจใช้วิธี multiplex PCR ร่วมด้วย วิธีนี้สามารถตรวจหาไวรัสหลายชนิดได้พร้อมกัน โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะจะสามารถแยก CAV ออกจากไวรัสอื่นๆ ที่ก่อโรคในไก่ได้ เช่น Avian reovirus (ARV), Infections Bursal Disease Virus (IBDV) เป็นต้น [39]

อย่างไรก็ตาม การควบคุม การป้องกันการแพร่ระบาดของไวรัส CAV ได้ถูกพัฒนาโดยอาศัยหลักการทางพันธุวิศวกรรม และภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว เช่น *Escherichia coli* หรือ ยีสต์ ในไวรัสเช่น Baculovirus เป็นต้น วิธีนี้ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก เนื่องจากใช้เวลาสั้น ประหยัด และให้ผลผลิตในปริมาณมาก และสามารถนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้ ใช้ฉีดกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีอย่าง โพลีโคลนอลแอนติบอดี หรือโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ [19, 40-42]

2.11 แอนติเจน (Antigen; Ag)

แอนติเจน คือ โปรตีนที่มีความสามารถในการทำปฏิกิริยาจับแบบจำเพาะกับองค์ประกอบต่างๆ ของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น แอนติบอดี หรือตัวรับบนผิวเซลล์ (receptor) สารที่มีสมบัติเป็นแอนติเจนเกือบทุกชนิดจะมีคุณสมบัติการเป็นอิมมูโนเจน (Immunogen) สามารถชักนำให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะได้ ยกเว้นสารที่มีโมเลกุลเล็กเรียกว่าแฮปเทน (Hapten) ซึ่งมีเฉพาะสมบัติของแอนติเจน แต่ไม่สามารถชักนำการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ โดยแฮปเทนจะเชื่อมกับโปรตีนขนาดใหญ่ ด้วยกระบวนการทางเคมี เกิดเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เกิดการผลิตแอนติบอดีได้ [43]

คุณสมบัติในการเป็นแอนติเจน (Antigenicity)

ความแปลกปลอม (Foreignness)

สิ่งแปลกปลอม คือ สิ่งที่ปกติจะไม่พบในร่างกาย หรืออาจมีในร่างกาย แต่มีอยู่น้อย ทำให้ไม่ตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย

ขนาดของโมเลกุล (Size)

แอนติเจนที่มีขนาดเล็ก มักมีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้น้อย จำเป็นต้องอาศัยแอนติเจนขนาดใหญ่เพื่อช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เช่น adjuvant ดังนั้นแอนติเจนยังมีขนาดโมเลกุลใหญ่ ยังมีคุณสมบัติ antigenic determinant ได้ดี

ปริมาณและทิศทางการเข้าสู่ร่างกาย (Dose and route of administration)

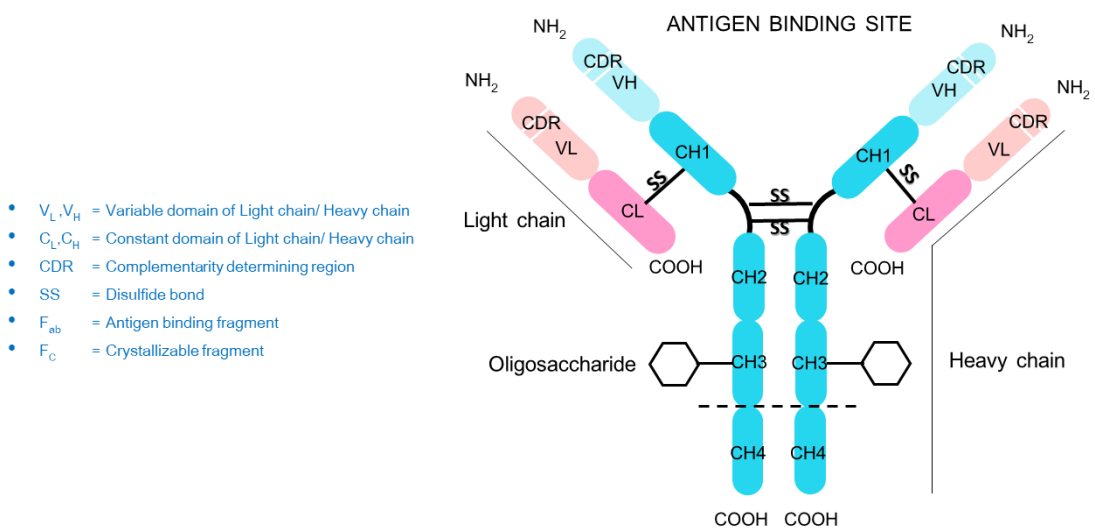
ปริมาณอิมมูโนเจนที่ใช้ มีผลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ทิศทางการแตกต่างกันในการนำอิมมูโนเจนเข้าสู่ร่างกาย สามารถส่งผลการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเช่นกัน

Adjuvant

เป็นสารที่ช่วยให้ร่างกายตอบสนองต่อแอนติเจนได้ดียิ่งขึ้น โดยเฉพาะแอนติเจนที่มีขนาดเล็ก นอกจากนี้ ยังช่วยให้แอนติเจนอยู่ในร่างกายได้นานขึ้น ทำให้ B cell ที่ถูกกระตุ้นสามารถผลิตแอนติบอดีต่อแอนติเจนชนิดนั้นๆ ได้

2.12 แอนติบอดี (Antibody; Ab)

แอนติบอดีหรืออิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin; Ig) เป็นไกลโคโปรตีน (Glycoprotein) ขนาดใหญ่ในระบบภูมิคุ้มกัน ร่างกายสร้างขึ้นจากเม็ดเลือดขาวชนิด บี-ลิมโฟไซต์ (B-lymphocyte) มีหน้าที่ตรวจจับ และทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย เช่น แบคทีเรีย หรือไวรัส แอนติบอดีแต่ละชนิด จะจดจำโมเลกุลเป้าหมายอย่างจำเพาะ เรียกแอนติเจน (Antigen) แอนติบอดีมีโครงสร้างเป็นรูปตัววาย (Y shape) ดังรูป 2.5

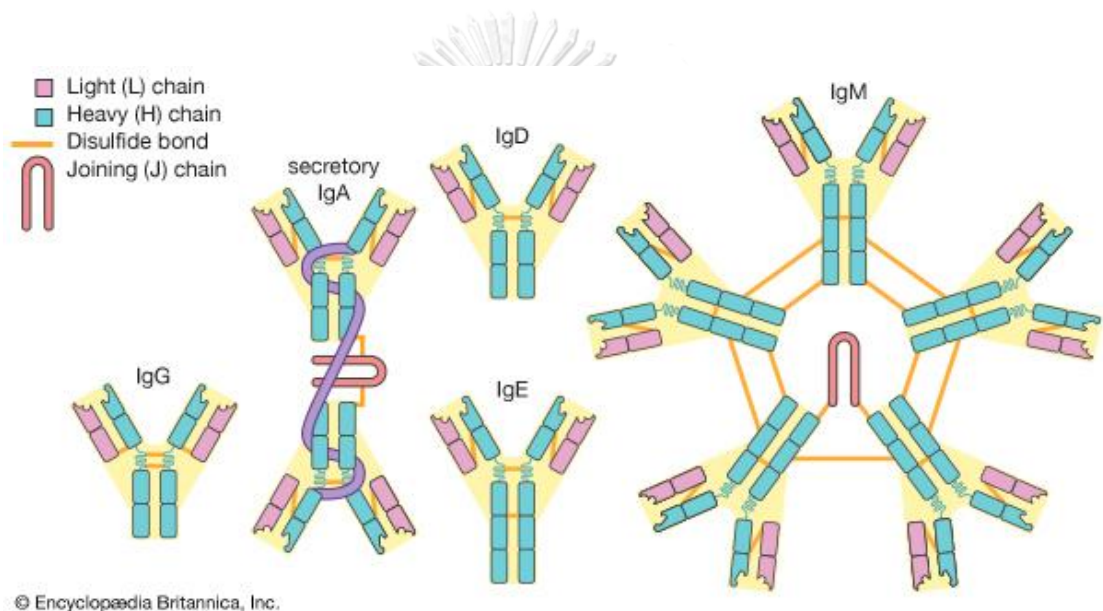


รูปที่ 2.5 โครงสร้างพื้นฐานของแอนติบอดี (เอกราช สิทธิเดช)

แอนติบอดีประกอบไปด้วยสายพอลิเปปไทด์ (polypeptide) ทั้งหมด 4 สาย มีส่วนสายยาวเรียก Heavy chain (H chain) จำนวน 2 สาย และส่วนสายสั้นเรียก Light chain (L chain) จำนวน 2 สาย เชื่อมด้วยพันธะไดซัลไฟด์ทั้งภายในสายและภายนอกระหว่างสายพอลิเปปไทด์ แรงยึดนี้สามารถแยกออกด้วยสารเมอร์แคปโทเอทานอล (mercaptoethanol) โครงสร้างของ Ig มี 4 แบบคือ โครงสร้างปฐมภูมิ โครงสร้างทุติยภูมิ โครงสร้างตติยภูมิ และโครงสร้างจตุรภูมิ โครงสร้างปฐมภูมิประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนในส่วนของ Variable region (V) และ Constant region (C) พบว่า H chain ประกอบด้วยพันธะ ไดซัลไฟด์ 4 แห่ง ส่วน L chain ประกอบด้วยพันธะไดซัลไฟด์ 2 แห่ง ซึ่งพันธะแต่ละแห่งจะมีผลทำให้สายพอลิเปปไทด์แบบ β -pleated sheet ขดพับไปมา ทำให้เกิดโครงสร้างทุติยภูมิทำให้มีความเสถียรภาพมากกว่าโครงสร้างปฐมภูมิ และเมื่อสายพอลิเปปไทด์ขดพับจนอัดแน่นเป็นก้อน (Globular protein) เกิดเป็นโครงสร้างตติยภูมิ สุดท้ายโดเมนที่อัดแน่นเป็นก้อนของ H chain และ L chain มารวมกันจนเกิดเป็นโครงสร้างจตุรภูมิซึ่งจะพบในส่วน Variable region ของโปรตีนทั้งสองสาย จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของ H chain และ L chain พบว่ากรดอะมิโนลำดับที่ 100-110 นับจากปลาย NH_2 หรือปลาย N terminal จะมีการแปรผันของลำดับกรดอะมิโนสูงมาก (Variable region) โดยแตกต่างกันในแอนติบอดีแต่ละชนิด และยังเป็นบริเวณที่จับแอนติเจนได้อีกด้วย ส่วนบริเวณที่เหลือเป็นบริเวณอนุรักษ์ (Constant region) มีความแตกต่างกันตามชนิด

ของโปรตีน โดยโปรตีนสายยาวจะจำแนกอิมมูโนโกลบูลินออกเป็น 5 ไอโซไทป์ ได้แก่ IgM, IgG, IgA, IgD และ IgE นอกจากนี้สามารถจำแนกออกเป็น 5 ชนิดได้แก่ μ , γ , α , δ หรือ ϵ ส่วนโปรตีนสายสั้นจะจำแนกเป็น 2 ชนิดได้แก่ K หรือ λ อิมมูโนโกลบูลินแต่ละไอโซไทป์ มีความแตกต่างกันในส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรต, antigenic determinant, น้ำหนักของโมเลกุล, คุณสมบัติทางชีวภาพ หรือการเคลื่อนที่โดยใช้กระแสไฟฟ้า (Electrophoresis) [44]

คลาสหรือไอโซไทป์ (Isotype) ของ Ig เกิดจากความแตกต่างกันของลำดับกรดอะมิโนบนโปรตีนสายยาว ณ ตำแหน่ง constant region ทำให้แอนติบอดีมีรูปร่างที่แตกต่างกันได้แก่ IgM, IgG, IgA, IgD และ IgE (รูป 2.6) และมีบทบาทการทำงานที่ต่างกันไปดังตารางที่ 2.1 [43]



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2.6 โครงสร้างทั่วไปของแอนติบอดีทั้ง 5 ไอโซไทป์ [45]

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติของอิมมูโนโกลบูลิน Class และ Subclass [43]

สมบัติ/ ปฏิกิริยา	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgM	IgE	IgD
น้ำหนัก โมเลกุล (kDa)	150	150	150	150-600	150-600	150-600	190	150
ชนิด H chain	γ_1	γ_2	γ_3	γ_4	α	μ	ϵ	δ
ระดับในซีรัม (mg/ml)	9	3	1	0.5	3	1.5	0.0003	0.03
Half-life (Day)	23	23	8	23	6	5	2.5	3
การกระตุ้น ระบบ คอมพลีเมนต์	+	+/-	++	-	-	+++	-	-
ผ่านรก	+	+/-	++	-	-	-	-	-
พบบน B-cell	-	-	-	-	-	+	-	+
จับกับตัวรับ Fc บน แมคโครฟาจ	++	+/-	++	+	-	+	-	-
พบใน สารคัดหลั่ง	-	-	-	-	++	+	-	-
ชักนำ การปล่อย สารในมาสต์ เซลล์	-	-	-	-	-	-	+	-

หมายเหตุ ระดับการทำงานแสดงโดยเครื่องหมาย ++ (สูง), + (ปานกลาง), +/- (เล็กน้อย), - (ไม่มี)

Immunoglobulin G (IgG)

IgG จะเป็นอิมมูโนโกลบูลินหลักที่พบในซีรัมประมาณ 75% สามารถจำแนกออกเป็น 4 กลุ่มย่อย โดยอาศัยตำแหน่ง constant region ของ H chain ได้แก่ γ_1 , γ_2 , γ_3 และ γ_4 จะแบ่งได้เป็น Subclass IgG1, IgG2, IgG3 และ IgG4 ตามลำดับ โดยทั้ง 4 กลุ่มย่อยนี้ ถูกถอดรหัสจากยีนที่แตกต่างกัน จึงมีลักษณะที่ต่างกันของแต่ละกลุ่มย่อย เช่น จำนวนและตำแหน่งของพันธะไดซัลไฟด์ ขนาดของข้อพับบริเวณ Hinge region ซึ่งอยู่ระหว่างบริเวณ constant region กับ variable region และด้วยคุณสมบัติในการเข้าผ่านรกได้ สามารถพบ IgG ใน extra vascular spaces ทำหน้าที่เป็นตัวขนส่ง โดย receptor บนผิวเซลล์จับกับ Fc domain ของ IgG นอกจากนี้ IgG1 และ IgG3 สามารถจับกับ receptor บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวอย่างเซลล์แมคโคเฟจ (Macrophages), เซลล์โมโนไซต์ (Monocytes) และเซลล์ลิมโฟไซต์ (Lymphocytes) จะชักนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวข้างต้นจับกับสิ่งแปลกปลอมในร่างกาย หรือที่เรียกว่าแอนติเจนแล้วเกิดกระบวนการ phagocytosis [43, 44]

Immunoglobulin A (IgA)

เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่พบมากที่สุดเป็นอันดับที่ 2 ในร่างกาย สามารถพบได้ในสารคัดหลั่ง ได้แก่ น้ำลาย เยื่อเมือก น้ำตา และน้ำนม โดย IgA มีโครงสร้างเป็น monomer 2 ตัว เชื่อมกันด้วยสาย J chain (เป็น domain พิเศษบนสายของ C_{H4} ยึดติดกันด้วยพันธะโควาเลนต์ เกิดเป็นพันธะระหว่างสาย ไดซัลไฟด์) กลายเป็นโครงสร้างแบบ dimer และมีโปรตีน secretory piece (T piece) ช่วยพา IgA ผ่านเยื่อเมือกและป้องกันการถูกย่อยได้ นอกจากนี้ IgA ทำหน้าที่ป้องกันการติดเชื้อบริเวณเยื่อเมือก

Immunoglobulin M (IgM)

เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่มีขนาดใหญ่ที่สุด เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่พบเป็นชนิดแรกเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย โดย IgM มีโครงสร้างเป็น monomer 5 ตัว เชื่อมกันด้วยสาย J chain เช่นเดียวกับ IgA กลายเป็นโครงสร้างแบบ pentamer ทำให้ IgM มีคุณสมบัติในการยึดจับแอนติเจนได้ดี นอกจากนี้ยังช่วยกระตุ้นโปรตีนต่างๆ ในซีรัมนำไปสู่การย่อยจุลินทรีย์ต่างๆ และสามารถใช้ตกตะกอนแอนติเจนได้

Immunoglobulin D (IgD)

มีโครงสร้างเป็น monomer เหมือน IgG เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่พบบริเวณผิวของบีเซลล์ IgD ไม่สามารถจับกับโปรตีนต่างๆ ในซีรัมได้ และปัจจุบันยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด แต่คาดว่า IgD มีส่วนช่วยในการกระตุ้นบีเซลล์ไปเป็น plasma cell

Immunoglobulin E (IgE)

เป็นอิมมูโนโกลบูลินที่พบน้อยที่สุดในซีรัม มีโครงสร้างเป็น monomer และมีส่วน extra domain อยู่ในบริเวณ constant region โดย IgE จับอยู่ที่ผิวมาสต์เซลล์ (Mast cell) หรือเบโซฟิล (Basophils) เมื่อถูกแอนติเจนกระตุ้นจะหลั่งสารที่ก่ออาการแพ้ หรือฮีสตามีน นอกจากนี้ IgE ที่อยู่บนผิวของอีโอซิโนฟิล (Eosinophils) สามารถกำจัดหนอนพยาธิ (Helminths) และเป็นอิมมูโนโกลบูลินอินดิเคเตอร์ (indicator) ในการบ่งชี้ ในผู้ป่วยที่เป็นโรคพยาธิ (Parasitic Helminth Diseases) ได้

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของโปรตีนสายยาวและสายสั้น ของ Ig ไอโซไทป์ต่างๆ

Class	สายยาว	สายสั้น	Subclass	องค์ประกอบ
IgM	μ	K หรือ λ	-	$(\mu_2 K_2)_n$ $(\mu_2 \lambda_2)_n$ n= 1 หรือ 5
IgG	γ	K หรือ λ	$\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$ และ γ_4	$\gamma_1 K_2,$ $\gamma_1 \lambda_2$
IgA	A	K หรือ λ	α_1 และ α_2	$(\alpha_2 K_2)_n$ $(\alpha_2 \lambda_2)_n$ n= 1, 2, 3 หรือ 4
IgD	Δ	K หรือ λ	-	$\delta_1 K_2$ $\delta_1 \lambda_2$
IgE	E	K หรือ λ	-	$\epsilon_1 K_2$ $\epsilon_1 \lambda_2$

2.13 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody)

ในปีค.ศ. 1975 George Kohler และ Cesar Milstein ได้พัฒนาเทคนิคการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนได้ ทำให้ทั้งสองได้รับรางวัลโนเบลในปีค.ศ. 1984 สาขาการแพทย์ด้านวิทยาคู่มักกัน [46] ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้นำความรู้ด้านวิทยาคู่มักกันไปประยุกต์ใช้ โดยมีความแม่นยำ และมีความไวสูง เช่น การประยุกต์ใช้รักษาโรคมะเร็ง [47, 48] หรือการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีตรวจหาสารตกค้าง [49-51]

แอนติบอดีจะถูกจำแนกออกตามลักษณะเด่นได้เป็น 2 ประเภท คือ โพลีโคลนอลแอนติบอดี (Polyclonal antibody; PAb) และโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody; MAb) กล่าวคือ โพลีโคลนอลแอนติบอดี คือแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแต่ละเอพิโทป (Epitope) ที่อยู่รวมกันในซีรัม ซึ่งความหลากหลายของแอนติบอดีอาจลดประสิทธิภาพในการใช้งาน เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดี (Cross reaction) กับแอนติเจนที่ปนเปื้อนในซีรัม ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี คือ แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเอพิโทปเพียงบริเวณเดียว สามารถลดการเกิดปฏิกิริยาข้ามได้ และนอกจากนี้ สามารถจำแนกความแตกต่างของแอนติบอดีทั้ง 2 ชนิด (ตารางที่ 2.3) [52, 53]

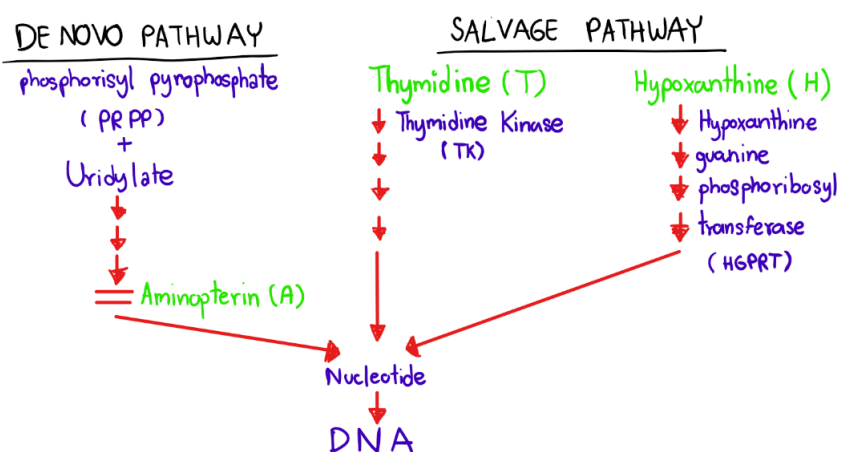
ตารางที่ 2.3 ข้อดีและข้อจำกัดระหว่างโพลีโคลนอลแอนติบอดี และโมโนโคลนอลแอนติบอดี

คุณสมบัติ	โพลีโคลนอลแอนติบอดี	โมโนโคลนอลแอนติบอดี
1. ความจำเพาะ (SPECIFICITY)	ความจำเพาะต่ำ เกิด cross reaction ได้	ความจำเพาะสูงมาก
2. สัมพรรคภาพ (AFFINITY)	ไม่คงที่	คงที่
3. ความเข้มข้นที่ผลิตได้	ประมาณ 1 mg/ml	ประมาณ 100-200 µg/ml
4. ปริมาณที่ผลิตได้	ประมาณ 0.5 ml ในหนู mice	ปริมาณไม่จำกัดในถังปฏิกรณ์
5. คุณภาพของแอนติบอดี	แตกต่างกันไปตามการตอบสนองของสัตว์ทดลอง	สามารถควบคุมให้คงที่ได้
6. สายพันธุ์ของสัตว์ที่ใช้	หลากหลาย	จำกัด
7. เวลาที่ใช้ผลิต	ไม่เกิน 6 สัปดาห์	อย่างน้อย 4 เดือน
8. ต้นทุนที่ใช้ผลิต	ต่ำ	สูง

2.14 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

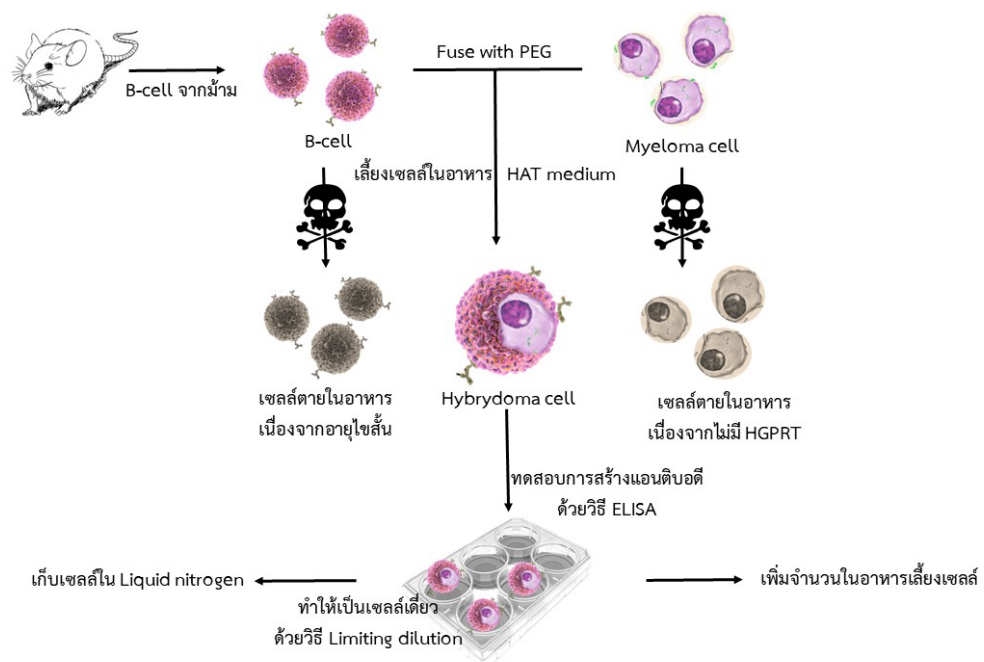
การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นต้องใช้แอนติเจนที่ต้องการกระตุ้นให้ บีลิมโฟไซต์ (B-lymphocyte; B cell) ผลิตแอนติบอดีที่ต้องการ โดยฉีดกระตุ้นในสัตว์ทดลอง และนำบีลิมโฟไซต์มาหลอมรวมกับเซลล์มะเร็งของพลาสมาเซลล์หรือไมอีโลมา (Myeloma cell) เพื่อให้ได้เซลล์ลูกผสม (Hybridoma cell) เนื่องจากบีลิมโฟไซต์มีข้อจำกัดคืออายุสั้น ปัจจุบันการหลอมรวมเซลล์นิยมใช้ polyethylene glycol (PEG) ทำให้เกิดการรวมตัวกันของเซลล์เมมเบรนของเซลล์ทั้งสองชนิด ก่อนจะมีการส่งผ่านจีโนมเข้าไซโตพลาสซึมของอีกเซลล์

Hybridoma cell มีคุณสมบัติในการผลิตแอนติบอดีได้ตามต้องการและมีอายุไม่จำกัด โดยเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่เติม Hypoxanthine, Aminopterin และ Thymidine กลายเป็น selective medium ที่มีชื่อว่า HAT medium ซึ่งเป็นอาหารที่ใช้คัดเลือกเซลล์ลูกผสม และสามารถเจริญเติบโตในอาหารนี้ได้ Aminopterin ทำหน้าที่ยับยั้ง de novo pathway หรือกล่าวคือ Aminopterin เป็นสารที่เป็น analog ของ folic acid ซึ่งจับกับเอนไซม์ folic acid reductase ยับยั้ง Co-enzyme ที่ใช้สังเคราะห์ DNA ใน de novo pathway เซลล์ที่สามารถอยู่รอดในอาหาร HAT medium จำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์สำคัญ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase (HGPRT) เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ guanosine monophosphate (GMP) และ adenosine monophosphate (AMP) จาก Hypoxanthine และเอนไซม์ Thymidine Kinase (TK) จะช่วยสร้าง thymidylate ในการสร้าง DNA ผ่าน salvage pathway ซึ่งถ้าขาดเอนไซม์ตัวใดตัวหนึ่งจะไม่สามารถสร้าง DNA และไม่สามารถอยู่รอดได้ในอาหาร HAT medium (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.7 วิธีสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของไมอีโลมาโดย De novo pathway และ Salvage pathway ดัดแปลงจากหนังสือเทคโนโลยีทางภูมิคุ้มกันวิทยา [52]

การทดลองในห้องปฏิบัติการจะใช้ไมอีโกลมาที่มีคุณสมบัติอายุไม่จำกัด แต่มีความบกพร่องของเอนไซม์ HGPRT ซึ่งจะตายในอาหาร HAT medium จึงต้องหลอมรวมเซลล์กับ B-cell ซึ่งมีสมบัติในการสร้างเอนไซม์ HGPRT และสร้างแอนติบอดีแต่มีอายุสั้น แล้วใช้ selective medium ในการคัดเลือกเซลล์ที่รอด (รูปที่ 2.8) [54] เนื่องจากเซลล์ไฮบริโดมาที่ได้ สามารถผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ใช้ฉีดกระตุ้นในหนูทดลองได้เพียงบางเซลล์เท่านั้น จึงต้องทำการคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีที่ต้องการด้วยวิธี Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) นำเซลล์ที่คัดเลือกมาโคลนซ้ำ (Re-clone) เพื่อเพิ่มปริมาณแอนติบอดีต่อไป



CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 2.8 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีในหนูทดลอง (เอกราช สิทธิเดช)

2.15 หลักการในการตรวจติดตามแอนติบอดีโดยวิธี Enzyme Linked Immunosorbent

Assay (ELISA)

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นหลักการที่ตรึงแอนติเจนหรือแอนติบอดีบนผิววัสดุ และตรวจติดตามปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนหรือแอนติบอดีกับสับสเตรท ซึ่งแอนติเจนที่นิยมใช้ได้แก่ Alkaline phosphatase (AP) และ Horseradish peroxidase (HRP) โดยแอนติเจนจะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้สับสเตรทที่จับอยู่เปลี่ยนสี จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 1 โมลาร์ กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง วิธีนี้ถูกพัฒนาให้เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ปลอดภัยจากรังสีอันตราย และใช้ตรวจสอบแอนติเจนและแอนติบอดีในแง่ของคุณภาพ หรือปริมาณได้ [52, 55]

เทคนิคที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ คือ Indirect ELISA ใช้สำหรับตรวจสอบแอนติบอดี เช่น การคัดเลือกเซลล์ไฮบริโดมาที่สามารถผลิตแอนติบอดีต่อแอนติเจน หรือใช้ตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนในซีรัม วิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับแอนติเจนที่ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้ว หลักการ คือ ตรึงแอนติเจนในหลุม 96 well plate จากนั้นใส่แอนติบอดีที่ต้องการตรวจสอบ นำไปบ่ม ในเวลาถัดมาล้างแอนติบอดีที่ไม่จับกับแอนติเจนออก แล้วเติมแอนติบอดีทุติยภูมิ ที่ติดฉลากด้วยแอนติเจนซึ่งต้องจำเพาะต่อแอนติบอดีของสัตว์ทดลองที่ใช้ นำไปบ่มต่อและล้างแอนติบอดีที่ไม่จับกันออก จากนั้นเติมสารละลายสับสเตรทและหยุดปฏิกิริยา (Stop solution) ด้วย 1 โมลาร์ กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) สังเกตเห็นสีที่เปลี่ยนไปในแต่ละหลุม และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง การเลือกใช้ค่าการดูดกลืนแสงขึ้นกับสับสเตรทที่ใช้ (ตารางที่ 2.4) [43]

ตารางที่ 2.4 โครโมจีนิกสับสเตรทสำหรับ Horseradish peroxidase (HRP)

สารเคมี	สีหลังหยุดปฏิกิริยา	ความยาวคลื่นที่ใช้
2,2'-azinodi-[ethylbenzthiazoline] sulfonate (ABTS)/ H_2O_2	เขียว	405 nm
O-phenylene diamine (OPD)/ H_2O_2	น้ำตาล	492 nm
3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)/ H_2O_2	เหลือง	450 nm

2.16 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ของไวรัสโลहितจางในไก่

Chansiripornchai และคณะ (2013) ได้พัฒนาวิธี Indirect ELISA โดยนำเชื้อไวรัส CAV ที่แยกได้ในประเทศไทยใช้เป็นแอนติเจนสำหรับทำ indirect ELISA เปรียบเทียบกับชุดทดสอบสำเร็จรูป IDEXX ELISA test kit พบว่ามีความไวและความจำเพาะเท่ากับ 93%, 78% และ 86% ตามลำดับ นอกจากนี้ผลทดสอบทั้งสองวิธียังสอดคล้องกันซึ่งแสดงค่า Kappa value เท่ากับ 0.71

Lee และคณะ (2009) ได้สร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a-VP1 และ pET28a-VP2 ของไวรัสโลहितจางในไก่ โดยชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่ามีเพียงรีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a-VP2 ที่ให้ผลการแสดงออกของโปรตีน ทางผู้วิจัยอภิปรายผลว่า ที่ปลาย N-Terminal ของโปรตีน VP1 ณ กรดอะมิโนลำดับที่ 50-60 มี Arginine อยู่มาก ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* ทำให้ไม่สามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกโปรตีนได้ ทางผู้วิจัยจึงตัดกรดอะมิโนลำดับที่ 30, 60 และ 129 สร้างเป็น รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a-VP1ND30, ND60 และ ND129 และนำไปชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย IPTG พบว่า pET28a-VP1ND129 ให้ผลการแสดงออกสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ pET28a-VP1ND30, ND60 และ pET28a-VP2 โปรตีน pET28a-VP1ND129 มีความเข้มข้นเท่ากับ 26.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าโปรตีน pET28a-VP2 มีความเข้มข้นเท่ากับ 15.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

Trinh และคณะ (2015) ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน VP1 ของไวรัสโลहितจางในไก่ ใช้ไวรัสโลहितจางสายพันธุ์ CAV-A2/76 โดยฉีดแอนติเจนในหนูเม้าส์สายพันธุ์ BALB/c ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้งหมด 4 โคลน ได้แก่ MoCAV/F2, MoCAV/F8, MoCAV/F11 และ MoCAV/E6 ซึ่งมีไอโซไทป์เป็น IgG₁, IgG₁, IgG_{2b} และ IgG_{2a} ตามลำดับ จากนั้นผู้วิจัยได้สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pcDNA3.1(+)-VP1 แล้วชักนำให้เกิดการแสดงออกในเซลล์ COS 7 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ growth medium (GM) พบว่ามีการตอบสนองต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลน MoCAV/F2, MoCAV/F8 และ MoCAV/F11 นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาสมบัติการ neutralizing ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 โคลน โดยใช้ไวรัส CAV 14 สายพันธุ์ ทำให้ติดเชื้อในเซลล์ MDCC-MSB1 (MSB1 cell) เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ GM เป็นเวลา 36 ชั่วโมง และ treat ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 4 โคลน พบว่าแอนติบอดีโคลน MoCAV/F2, MoCAV/F8 และ MoCAV/F11 มีคุณสมบัติในการเป็น neutralizing antibody ได้โดยแอนติบอดีโคลน MoCAV/F2 และ MoCAV/F8 สามารถ treat CAV ได้ 14 สายพันธุ์ ส่วนโคลน MoCAV/F11 treat CAV ได้ 5 สายพันธุ์ ตามลำดับ

บทที่ 3
วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

3.1 จุลินทรีย์และสัตว์ทดลอง

ตารางที่ 3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

แบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย	จีโนมไทป์
<i>Escherichia coli</i> สายพันธุ์ DH5 α	<i>supE44 F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG ϕ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169, hsdR17(r_k⁻ m_k⁺), λ-</i>
<i>Escherichia coli</i> สายพันธุ์ Rosetta-gami	<i>Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC gale galK rpsL F' [lac⁺ lac^f pro] gor522: Tn10 trxB pRARE2 (Cam^R, Str^R, Tet^R)</i>

ตารางที่ 3.2 สัตว์ทดลองที่ใช้ในงานวิจัย

สัตว์ทดลองที่ใช้ในงานวิจัย	แหล่งที่มา
หนูเมาส์ สายพันธุ์ BALB/c (inbred strain) เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ จำนวน 4 ตัว	National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakornpathom, Thailand

3.2 เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme)

ตารางที่ 3.3 เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในงานวิจัย

เอนไซม์ตัดจำเพาะ	บริเวณตัดจำเพาะ (5'-3')	อุณหภูมิในการบ่ม (° ซ)	บัฟเฟอร์
<i>Nde</i> I	CA ^V TATg	37	Buffer O
<i>Xho</i> I	C ^V TCGAg	37	Buffer R

3.3 ไพรเมอร์ (Primers)

ตารางที่ 3.4 ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	T _m (° ซ)
CAV_181_579 F <i>Nde</i> I ¹	ggggg <u>CATATg</u> CTgCCgAACCCCAATCT <i>Nde</i> I	58
CAV_181_579 R <i>Xho</i> I	ggggg <u>CTCgAg</u> <u>TTA</u> CATgTCTTgCAgggTCA <i>Xho</i> I stop	58
CAV_580_931 F <i>Nde</i> I ²	ggggg <u>CATATg</u> ggTCgCATgTTTgggggC <i>Nde</i> I	60
CAV_580_931 R <i>Xho</i> I	ggggg <u>CTCgAg</u> <u>TTA</u> ATATgTgTCCCATgACCA <i>Xho</i> I stop	58
CAV_932_1180 F <i>Nde</i> I ³	ggggg <u>CATATg</u> AgCTTTgCAACTCACA <i>Nde</i> I	52
CAV_932_1180 R <i>Xho</i> I	ggggg <u>CTCgAg</u> <u>TTA</u> CTgCgACTTATTTgTgCC <i>Xho</i> I stop	60
CAV_1181_1350 F <i>Nde</i> I ⁴	ggggg <u>CATATg</u> CAgTACAAgTTCggCACA <i>Nde</i> I	54
CAV_1181_1350 R <i>Xho</i> I	ggggg <u>CTCgAg</u> <u>ICA</u> gggCTgCgACCCCAgTA <i>Xho</i> I stop	70

¹ เป็นไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม ด้านหน้าและด้านหลังของ Fragment 1 (F1)

² เป็นไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม ด้านหน้าและด้านหลังของ Fragment 2 (F2)

³ เป็นไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม ด้านหน้าและด้านหลังของ Fragment 3 (F3)

⁴ เป็นไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม ด้านหน้าและด้านหลังของ Fragment 4 (F4)

ตารางที่ 3.5 ไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

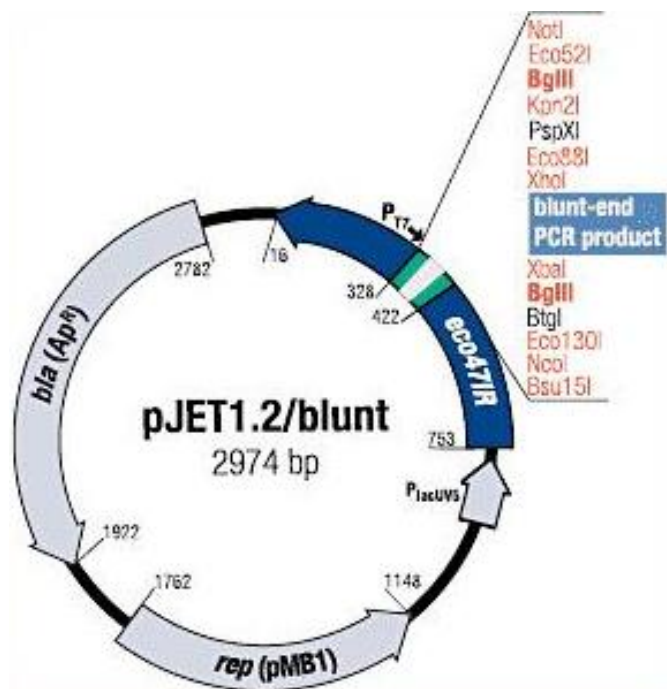
ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	T _m (° ซ)
CAV_Fragment1 S1-F <i>Nde</i> ¹	gggg <u>CATATg</u> CTgCCgAACCCC <i>Nde</i>	58
CAV_Fragment1 S1-R <i>Xho</i>	gggg <u>CTCgAg</u> <u>TTA</u> gTggTCTgCATA <i>Xho</i> stop	62
CAV_Fragment1 S2-F <i>Nde</i> ²	gggg <u>CATATg</u> TTgTACgggg <i>Nde</i>	48
CAV_Fragment1 S2-R <i>Xho</i>	gggg <u>CTCgAg</u> <u>TTA</u> CATgTCTTg <i>Xho</i> stop	52

¹ เป็นไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม ด้านหน้าและด้านหลังของ Separating 1 (S1)

² เป็นไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม ด้านหน้าและด้านหลังของ Separating 2 (S2)

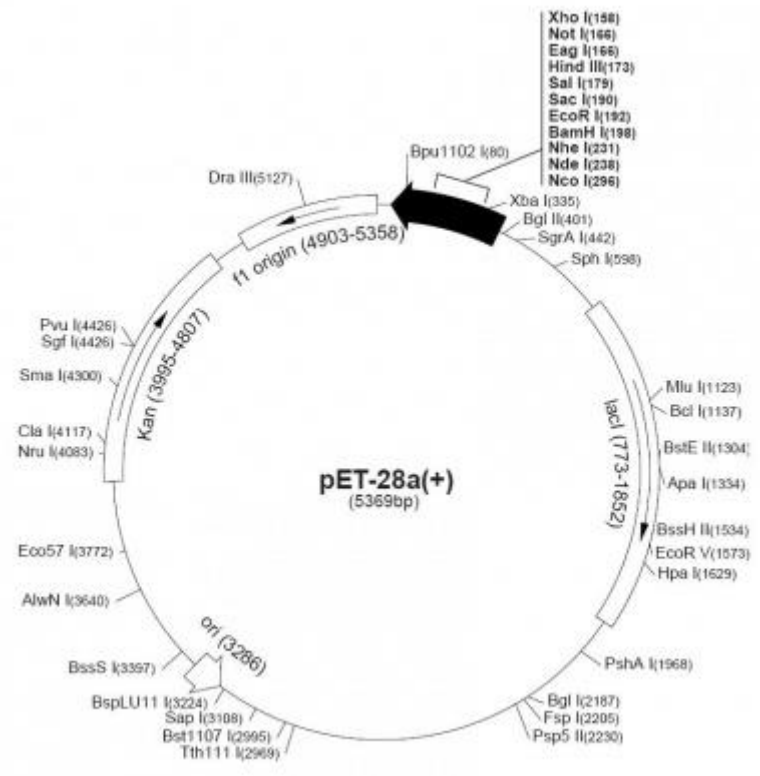


3.4 เวกเตอร์ (Vector)



รูปที่ 3.1 แผนภาพของ pJET1.2/blunt cloning vector [56]

ELEMENT	POSITION (BP)
1. T7 PROMOTER	305-324
2. INSERTION SITE	371-372
3. MULTIPLE CLONING SITE (MCS)	422-328
4. <i>ECO47IR</i>	753-16
5. P_{LACUV5}	892-769
6. REPLICATION START	1162±1
7. REP (PMB1)	1762-1148
8. <i>BLA (AP^R)</i>	2782-1922
9. PJET1.2 FORWARD SEQUENCING PRIMER	310-332
10. PJET1.2 REVERSE SEQUENCING PRIMER	428-405



รูปที่ 3.2 แผนภาพของ pET-28a (+) vector [57]

ELEMENT	POSITION (BP)
1. T7 PROMOTER	370-386
2. T7 TRANSCRIPTION START	369
3. HIS TAG CODING SEQUENCE	270-287
4. T7 TAG CODING SEQUENCE	207-239
5. MULTIPLE CLONING SITES (BAMH I-XHO I)	158-203
6. T7 TERMINATOR	26-72
7. PBR322 ORIGIN	3286
8. KAN CODING SEQUENCE	3995-4807

3.5 วัสดุและสารเคมี

ตารางที่ 3.6 วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

วัสดุและสารเคมี	แหล่งที่มา
1 kb DNA Ladder	Thermo scientific
48 well plate	Corning Incorporated
96 well plate	Corning Incorporated
100 base pair	Thermo scientific
Anti-His monoclonal antibody	Invitrogen
CloneJET PCR Cloning kit	Thermo scientific
SnakeSkin [®] Dialysis Tubing	Thermo scientific
Fetal Bovine Serum (FBS)	Hyclone
Freund's complete adjuvant (FCA)	Sigma
Freund's incomplete adjuvant (FIA)	Sigma
Gel extraction Kit	Qiagen
High fidelity PCR enzyme mix	Thermo scientific
Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG	Invitrogen
Immuno plate	Thermo scientific
Myeloma cell (P3X)	ผศ. ดร. นันทิกา คงเจริญพร
Monoclonal antibody against $\Delta 60N_VP1$	ศรุดา หวังอนุรักษกุล (2558)
His-Trap column Ni ²⁺ - NTA affinity chromatography	GE Healthcare Life Sciences
<i>Nde</i> I	Thermo scientific
Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane	Bio-Rad
Prestained protein molecular weight marker	Bio-Rad
Recombinant $\Delta 60N_VP1$	ศรุดา หวังอนุรักษกุล (2558)
RPMI-1640	Merk
T4 DNA ligase	New England Biolabs
TMB	Sigma
Tricine powder	TCI
<i>Xho</i> I	Thermo scientific
λ - <i>Hind</i> III	Thermo scientific

บทที่ 4 วิธีดำเนินการทดลอง

4.1 ศึกษาการตอบสนองของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี

4.1.1 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิด $\Delta 60N_VP1$

ย้ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a ที่มียีน $\Delta 60N_VP1$ ที่อยู่ในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α ซึ่งได้จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ (ศรุดา หวังอนุรักษกุล, 2558) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* Rosetta gami โดยวิธี heat shock นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a- $\Delta 60N_VP1$ ความเข้มข้น 10-50 นาโนกรัม ผสมกับคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* Rosetta gami บ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที จากนั้น heat shock ที่อุณหภูมิ 42° ซ เป็นเวลา 90 วินาที แล้วบ่มบนน้ำแข็งต่อ เป็นเวลา 10 นาที ทำการเติมอาหารเหลว Luria Bertani medium : LB (ภาคผนวก) ปริมาตร 850 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ ความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำเซลล์มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อออก 800 ไมโครลิตร และละลายตะกอนกับอาหารที่เหลือ จากนั้นเกลี่ยสารละลายเชื้อลงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ คลอแรมฟินิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

4.1.2 ชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน

เลือกโคลนิจากข้อ 4.1.1 เลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะทั้งสองชนิด ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25° ซ ความเร็วรอบ 250 rpm ข้ามคืน จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) แล้วถ่ายเชื้อ 1.25 OD_{600} ลงในอาหารเหลว ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปบ่มต่อตามวิธีการข้างต้นจนกระทั่งได้ค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.4 OD_{600} จากนั้นชักนำให้เกิดการแสดงออกโดยเติมสาร isopropyl- β -D-1-thiogalactoside (IPTG) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 มิลลิโมลาร์ และเลี้ยงต่อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์ 1 OD_{600} ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 60 วินาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งแล้วเก็บตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ -20° ซ

4.1.3 วิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting analysis

4.1.3.1 วิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

นำเซลล์จากข้อ 4.1.2 มาทำสารผสม (master mix) โดยเติม 4X-sample buffer (ภาคผนวก) ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร, β -mercaptoethanol ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 1X PBS (ภาคผนวก) ปริมาตร 32.5 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมทั้งหมดเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วต้มในน้ำเดือด 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสไปรีนเจลเพื่อแยกขนาดโปรตีนโดยใช้ Glycine-SDS-PAGE (ตารางที่ 4.1) หรือ Tricine-SDS-PAGE (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.1 เตรียมเจลสำหรับวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Glycine-SDS-PAGE

ส่วนประกอบ	13% Separating gel	5% Stacking gel
น้ำกรอง	5.95 ml	6.8 ml
1.5M Tris-HCl, pH8.8	5 ml	-
1M Tris-HCl, pH6.8	-	1.25 ml
10% (w/v) SDS	0.2 ml	0.1 ml
30% acrylamide	8.65 ml	1.7 ml
TEMED	8 μ l	10 μ l
10% (w/v) APS*	0.2 ml	0.1 ml

หมายเหตุ *ammonium persulfate (APS)

ทำการแยกขนาดโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าที่ 90 โวลต์ เป็นเวลา 140 นาที จากนั้นแบ่งเจลเป็นสองส่วนเจลส่วนแรกย้อมด้วยสีย้อมเจล Commassie Blue (ภาคผนวก) เป็นเวลา 60 นาที และล้างสีย้อมเจลออกด้วย Destaining solution (ภาคผนวก) เป็นเวลา 30 นาทีต่อการล้างหนึ่งรอบ จำนวนสองรอบ สูดทำยเก็บรักษาเจลใน Fix solution (ภาคผนวก) เจลส่วนที่สองนำไปตรวจติดตามการแสดงออกโดยวิธี Western blotting analysis

ตารางที่ 4.2 เตรียมเจลสำหรับวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Tricine-SDS-PAGE

ส่วนประกอบ	18%T, 6%C Separating gel	10%T, 3%C Separating gel	5%T, 3%C Stacking gel
น้ำกรอง	1 ml	2.367 ml	1.7 ml
3X gel buffer (ภาคผนวก)	2 ml	2 ml	1 ml
Glycerol	0.6 ml	0.6 ml	-
55% acrylamide	2.18 ml	1 ml	0.3 ml
TEMED	2.5 μ l	3 μ l	4 μ l
10% APS	25 μ l	30 μ l	30 μ l

*T= Total percentage concentration of both monomers (acrylamide and bisacrylamide).

*C= The percentage concentration of the crosslinker relative to the total concentration T.

ทำการแยกขนาดโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าที่ 60 โวลต์ จนโปรตีนถึง 18%T, 6%C Separating gel ทำการปรับกระแสไฟฟ้าเป็น 140 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแบ่งเจลเป็นสองส่วน เจลส่วนแรกย้อมด้วยสีย้อมเจลตามวิธีข้างต้น เจลส่วนที่สองนำไปตรวจติดตามการแสดงออกโดยวิธี Western blotting analysis

4.1.3.2 ติดตามการแสดงออกด้วยวิธี Western blotting analysis

4.1.3.2A ถ่ายโอนโปรตีนจากเจลลงบนแผ่นเมมเบรน

ตัดกระดาษเมมเบรน polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane แช่ใน absolute methanol จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ แล้วนำไปแช่ใน 1X transfer buffer (ภาคผนวก) เป็นเวลา 15 นาที นำเจลส่วนที่สองจากข้อ 4.1.3.1 และแผ่น thick blot paper แช่ใน 1X transfer buffer เป็นเวลา 15 นาทีเช่นกัน การถ่ายโอนโปรตีนจากเจลลงแผ่นเมมเบรน โดยเครื่อง semi-dry transfer cell เริ่มจากวางแผ่น thick blot paper แผ่นแรกไว้ล่างสุด ตามด้วยกระดาษเมมเบรน (PVDF), แผ่นเจล และปิดด้วย thick blot paper แผ่นที่สองไว้บนสุดตามลำดับ ซิลอมด้วย transfer buffer และรีดฟองอากาศออกให้หมดด้วยลูกกลิ้ง ปิดฝาแล้วเริ่มการถ่ายโอนโปรตีนลงบนแผ่นเมมเบรนโดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ 120 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 90 นาที

4.1.3.2B Chemiluminescence และ autoradiography

นำแผ่นเมมเบรนจากข้อ 4.1.3.2A แช่ใน blocking buffer 5% skim milk-PBST (ภาคผนวก) เป็นเวลา 5 นาที สองรอบ จากนั้นใช้ Monoclonal antibody against VP1-CAV ที่ผลิตได้จากงานวิจัยก่อนหน้านี (ศรุตา หวังอนุรักษกุล, 2558) เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ เจือจางด้วย blocking buffer อัตราส่วน 1:5,000 บ่มที่อุณหภูมิ 4° ซ ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยสารละลาย PBST (1X PBS+ 0.05% Tween20) 4 รอบ รอบละ 15 นาที และบ่มต่อด้วย Horseradish peroxidase-conjugated goat anti mouse IgG เป็นแอนติบอดีทุติยภูมิ เจือจางด้วย blocking buffer อัตราส่วน 1:5,000 นำไปแช่ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที และล้างด้วยสารละลาย PBST 4 รอบ รอบละ 15 นาที จากนั้นบ่มแผ่นเมมเบรนในสารละลายสับสเตรท Chemiluminescence (ภาคผนวก) เป็นเวลา 60 วินาที ห่อแผ่นเมมเบรนด้วยพลาสติกใส และนำไปประกบกับแผ่นฟิล์ม X-ray ในห้องมืด ล้างแผ่นฟิล์ม X-ray ด้วยสารละลาย Developer และ Fixer สังเกตแถบสัญญาณที่เกิดขึ้นบนแผ่นฟิล์ม X-ray

4.2 ทำรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ให้บริสุทธิ์

4.2.1 ขยายขนาดการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน

ย้ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a ที่มียีน $\Delta 60N_VP1$ ที่อยู่ในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* Rosetta gami โดยวิธีจากข้อ 4.1.1 จากนั้นเลือก 1 โคลนี เลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25° ซ ความเร็วรอบ 250 rpm ข้ามคืน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD₆₀₀) แล้วถ่ายเชื้อ 3.75 OD₆₀₀ ลงในอาหารเหลว ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทั้งหมด 16 flasks นำไปบ่มตามวิธีข้างต้นจนกระทั่งค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.4 OD₆₀₀ จากนั้นชักนำให้เกิดการแสดงออกโดยเติมสาร isopropyl- β -D-1-thiogalactoside (IPTG) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 มิลลิโมลาร์ และเลี้ยงต่อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์ 400 OD₆₀₀ ใส่กระบอกเซนตริฟิวจ์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 20 นาที เทอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งแล้วเก็บรักษาตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ -20° ซ

4.2.2 เตรียมสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$

ละลายตะกอนเซลล์จากข้อ 4.2.1 ด้วยสารละลาย PCL lysis buffer (1X PBS, 1%SDS, 1mM DTT) ปริมาตร 0.1 เท่าของอาหารเลี้ยงเซลล์ เมื่อละลายตะกอนแล้วถ่ายใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร ทำเซลล์ให้แตกโดยการใช้คลื่นเสียง (sonication) ใช้ pulse on 45 วินาที pulse off 5 วินาที amplitude setting 40% เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นตกตะกอน SDS บนน้ำแข็งเป็นเวลา 60 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 20 นาที ย้ายส่วนน้ำใสไปยังหลอด เซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย PCW binding buffer (1X PBS, 0.1% Sakosyl) ให้มีปริมาตรเท่ากับ 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วกรองด้วย syringe filter ขนาด 0.45 ไมครอน

4.2.3 ทำรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ให้บริสุทธิ์

นำ His-Trap column Ni²⁺- NTA affinity chromatography ขนาด 5 มิลลิลิตร ทำให้อิ่มตัวด้วยสารละลาย PCW binding buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และนำสารละลายโปรตีนจากข้อ 4.2.2 ผ่านคอลัมน์ และเก็บส่วนที่ผ่านคอลัมน์ใช้เป็น Flow through fraction จากนั้นเติมสารละลาย PCE elution buffer (1X PCW, Imidazole 40mM/ 60mM/ 100mM/ 200mM/ 300mM) โดยเติม PCE ที่มีความเข้มข้นของ imidazole 40 และ 60 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ตามด้วย PCE ที่มีความเข้มข้นของ imidazole 100, 200 และ 300 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตามลำดับ ชะสารละลายโปรตีนที่ค้างอยู่ในคอลัมน์ออกด้วยสารละลาย Strip buffer (1X PBS, 50mM EDTA) ปริมาตร 50

มิลลิลิตร ตรวจสอบว่ามีโปรตีน โดยตกตะกอนด้วย 10% Trichloro-acetic acid (TCA) (การทดลองที่ 4.2.4) และวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ western blotting analysis (การทดลองที่ 4.1.3)

4.2.4 ตกตะกอนโปรตีนด้วย Trichloro-acetic acid (TCA)

เติม 100% (w/v) TCA ปริมาตร 1 ใน 10 เท่าของสารละลายแต่ละ fraction เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ TCA เท่ากับ 10% (v/v) ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มบนน้ำแข็งเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 20 นาที ดูดเอาส่วนน้ำใสออกแล้วเติม Acetone 200 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 5 นาที ดูด Acetone ออกปล่อยให้แห้งเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นละลายตะกอนโปรตีนด้วยสารละลาย 0.4 N NaOH ปริมาตร 32.5 ไมโครลิตร, 4X sample buffer ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร และ β -mercaptoethanol ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ตามลำดับ ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสไปวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และตรวจติดตามโดยวิธี Western blotting analysis (การทดลองที่ 4.1.3)

4.2.5 กำจัดสาร Sakosyl และ Imidazole ออกด้วยวิธี Dialysis

ต้มถุง Dialysis ใน 1% (w/v) EDTA ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที ล้างถุงด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ และมัดกันถุงให้แน่นด้วยเชือก จากนั้นดูด fraction ที่ความเข้มข้นของ Imidazole 200 มิลลิโมลาร์ และ 300 มิลลิโมลาร์ ใส่ในถุง มัดปากถุงให้แน่นแล้วยืดถุงกับแผ่นโฟมลอยน้ำ แช่ถุงใน 1X PBS buffer อัตราส่วน 1: 2,000 ทำการกวนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 4° ซ และเปลี่ยน 1X PBS buffer ทุก 2, 4, 12 และ 14 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์โดยวิธี Aquasorbition โดยนำถุง Dialysis คลุกกับผง Carboxymethylcellulose Sodium salt (CMC) จนปริมาตรของสารละลายในถุงลดเหลือประมาณ 2-5 มิลลิลิตร และกรองด้วย syringe filter ขนาด 0.45 ไมครอน แบ่งเก็บหลอดละ 1 มิลลิลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20° ซ

4.2.6 วัดความเข้มข้นของโปรตีนบริสุทธิ์ด้วยวิธี Bradford assay

เจือจางสารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA) ด้วย 1X PBS buffer ที่ระดับความเข้มข้น 7.8, 15.6, 31.2, 62.5 และ 125 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นผสม Bradford reagent (BIO-RAD) ปริมาตร 190 ไมโครลิตร กับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน 10 ไมโครลิตร แล้วหยดลง 96 well plate ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม ผสม Bradford reagent ปริมาตร 190 ไมโครลิตร กับตัวอย่างสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ 10 ไมโครลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม Blank ใช้ 1X PBS buffer 10 ไมโครลิตร

จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD₅₉₅ นาโนเมตร และนำผลที่ได้มาสร้างกราฟเส้นตรงเพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์

4.3 นำสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

4.3.1 เตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นการผลิตแอนติบอดี

เตรียมสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ $\Delta 60N_VP1$ ความเข้มข้นประมาณ 520 ไมโครกรัม โดยผสมกับ 1X PBS buffer ให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ต่อหนูเม้าส์ 1 ตัว ต่อการฉีดกระตุ้นการผลิตแอนติบอดี 1 ครั้ง

4.3.2 ฉีดกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง

ทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูเม้าส์ด้วยสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ที่เตรียมจากข้อ 4.3.1 โดยใช้หนูเม้าส์สายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ จำนวน 4 ตัว ฉีดกระตุ้นตัวละ 4 ครั้ง ทำการเก็บตัวอย่างเลือดที่แก้มหนู (Facial vein) ก่อนทำการฉีดกระตุ้นครั้งแรก 1 สัปดาห์ สำหรับใช้เป็น Pre-immune serum และเริ่มฉีดกระตุ้นบริเวณช่องท้องหนู (Intraperitoneal; IP) ด้วยสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์เข้มข้น 30 ไมโครกรัม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับ Freund's Complete Adjuvant (FCA) ในอัตราส่วน 1:1 ทำการฉีดกระตุ้นซ้ำทุกๆ 2 สัปดาห์ จนครบ 4 ครั้ง โดยครั้งถัดไปจะผสมสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์กับ Freund's Incomplete Adjuvant (FIA) ในอัตราส่วน 1:1 ทำการเก็บตัวอย่างเลือดทุก 1 สัปดาห์หลังฉีดกระตุ้นในแต่ละครั้ง นำตัวอย่างเลือดมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใส (serum) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4° ซ และนำไปทดสอบการตอบสนองโดยวิธี Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

4.3.3 ติดตามการผลิตแอนติบอดีโดยวิธี Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Indirect-ELISA)

ตรึงแอนติเจน $\Delta 60N_VP1$ ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บน 96 well plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4° ซ ซ้ำมคืน จากนั้นล้างแอนติเจนออกด้วย PBST ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 รอบ บล๊อคด้วย 5% skim milk-PBST ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นล้างด้วย PBST จำนวน 3 รอบ แล้วเติมแอนติบอดีปฐมภูมิความเข้มข้น 1:500, 1:1,000, 1:2,000, 1:4,000, 1:8,000 และ 1:16,000 ตามลำดับ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรและใช้อาหารเปล่าเป็นชุดควบคุมที่ให้ผลลบ ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ $\Delta 60N_VP1$ เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวก บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 60 นาที ล้าง 3 ครั้ง จากนั้นเติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่ติดฉลากด้วย Horseradish Peroxidase (HRP) ความเข้มข้น 1:10,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มต่อ 60 นาที แล้วล้างด้วย PBST 3 รอบ จากนั้นเติม substrate

(3, 3', 5, 5' - tetramethylbenzidine: TMB, DMSO, 205 mM phosphate citrate buffer, 30% H₂O₂) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 โมลาร์ กรดซัลฟูริก (H₂SO₄) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

4.3.4 ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน $\Delta 60N_VP1$

4.3.4.1 เตรียมเซลล์ไมอีโลมา (Myeloma cell)

เลี้ยงเซลล์ไมอีโลมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มี 15% Fetal Bovine Serum (FBS) เลี้ยงที่ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37° ซ เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนวันหลอมรวมเซลล์ 1 วัน เพื่อให้เซลล์แข็งแรง

4.3.4.2 เตรียมเซลล์ม้าม (Spleen cell)

การุณยฆาตโดยให้หนูดมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นตรึงหนูกับฐานยึด เก็บเลือดที่หัวใจ และผ่าเอาม้ามด้วยอุปกรณ์ปลอดเชื้อ ทำความสะอาดม้ามในอาหาร RPMI-1640 ที่มียาปฏิชีวนะ gentamycin จากนั้น บดม้ามให้เป็นเซลล์เดี่ยว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนอาหารทิ้ง แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหาร RPMI-1640 ที่มียาปฏิชีวนะ gentamycin

4.3.4.3 หลอมรวมเซลล์ (Cell fusion)

นำเซลล์ม้ามจากข้อ 4.3.4.2 ผสมกับไมอีโลมาเซลล์ในอัตราส่วน 1:1-1:5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนอาหารทิ้ง จากนั้นหยด 50% Polyethyleneglycol (PEG) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ช้าๆ ในเวลา 60 วินาที เติมน้ำอาหาร RPMI-1640 ปริมาตร 35 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1500 rpm 5 นาที เทอาหารทิ้ง แล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Hypoxanthine Aminopterin Thymidine (HAT-media) ที่มี 15% FBS จากนั้นกระจายสารละลายเซลล์ลง 96 well plate ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มที่ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37° ซ 7 วัน เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น Hypoxanthine Thymidine (HT-media) ที่ผสม 15% FBS ติดตามการผลิตแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect ELISA (การทดลองที่ 4.3.3) นำเซลล์ไฮบริโดมาที่ให้ผลบวกทำให้เป็นโคลนีเดี่ยวโดยวิธี Limiting dilution และติดตามการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี Indirect ELISA จากนั้นจึงเพิ่มปริมาณแอนติบอดีและเก็บรักษาต่อไป

4.3.5 หาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Isotype test)

ตรึงแอนติเจน $\Delta 60N_VP1$ ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลง 96 well plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4° ซ ชั่วโมง จากนั้นล้างแอนติเจนด้วย PBST ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 รอบ บล๊อคด้วย 5% skim milk-PBST ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที แล้วล้างด้วย PBST จำนวน 3 รอบ เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 6 โคลน หลุมละ 100 ไมโครลิตร โคลนละ 8 หลุมจาก A-H ใช้ RPMI-1640 + 15% FBS เป็น Blank นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 60 นาที และล้างด้วย PBST 3 รอบ จากนั้นเติมแอนติบอดี Isotyper (BIO-RAD) ทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ IgG1, IgG2_a, IgG2_b, IgG3, IgM, IgA, IgG kappa, IgG Lambda ความเข้มข้น 1:10 ลงหลุมของแต่ละแถวจาก 1-12 บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 60 นาที ทำการล้างด้วย PBST 3 รอบ เติมแอนติบอดีทุติยภูมิที่ติดฉลากด้วย Horseradish Peroxidase (HRP) ความเข้มข้น 1:5,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มต่อ 60 นาที แล้วล้างออก สุดท้ายเติม substrate (3, 3', 5, 5'- tetramethylbenzidine; TMB, DMSO, 205 mM phosphate citrate buffer, 30% H₂O₂) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 โมลาร์ กรดซัลฟูริก (H₂SO₄) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร

4.3.6 ทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Sensitivity test)

หาความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ทำได้โดยดูจากค่าความเข้มข้นของสารที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจวัดได้ (Limit of detection; LOD) โดยนำโมโนโคลนอลแอนติบอดี โคลนที่ 1, 3 และ 21 มาทำ 2 fold dilution จากนั้นใส่ตัวอย่างที่เจือจางแต่ละความเข้มข้น ลงใน 96 well plate ที่ตรึงด้วยแอนติเจน $\Delta 60N_VP1$ ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ติดตามผลด้วยวิธี Indirect ELISA (การทดลองที่ 4.3.3) และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้สร้างเป็นกราฟ

4.3.7 ทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โปรตีนจี

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 1 มาเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเซลล์ ISF-1 serum free แยกเซลล์ออกจากอาหารโดยปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรองอาหารด้วย filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร และทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography ใช้หลักการอาศัยการจับแบบจำเพาะระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ในการทดลองนี้จะเลือกใช้คอลัมน์ Hi-Trap protein G HP ขนาด 5 มิลลิลิตร (GE Healthcare) เริ่มจาก equilibrate คอลัมน์ด้วย 20 mM Sodium phosphate buffer pH 7.2 (buffer B) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่กรองแล้ว ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ผ่านเข้าคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ล้างแอนติบอดีที่ไม่จับกับโปรตีนจีออกด้วยด้วย buffer A ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ทำการชะแอนติบอดีที่จับกับ

โปรตีนจีด้วย 0.1 M glycine-HCl pH 2.7 (buffer A) พร้อมเก็บสารละลายแอนติบอดีที่ หลุดออกมา fraction ละ 1 มิลลิลิตร (แต่ ละ หลอด เก็บ fraction จะมี 1M Tris-HCl, pH 9 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อปรับให้ pH ของ fraction ที่หลุด ออกมามี pH 7) จากนั้นนำสารละลายแอนติบอดีบริสุทธิ์ที่ได้แต่ละ fraction วัดค่าการ ดูดกลืนแสงที่ OD₂₈₀ นาโนเมตร และหาความเข้มข้นของสารละลายแอนติบอดีด้วยวิธี BCA protein assay

4.3.8 วัดความเข้มข้นของแอนติบอดีบริสุทธิ์ด้วยวิธี BCA protein assay

เจือจางสารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA) ด้วย 1X PBS buffer ความเข้มข้น ดังนี้ 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้น หยดสาร BSA, แอนติบอดีก่อนและหลังทำให้บริสุทธิ์, flow through และอาหาร ISF-1 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลง 96 well plate ตามด้วย Bicinchoninic acid: BCA (Thermo Scientific) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม ผสมให้เข้ากัน ส่วน Blank จะใช้ 1X PBS buffer บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD₅₆₀ นาโนเมตร และนำผลที่ได้มาสร้างกราฟเส้นตรงเพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลาย แอนติบอดีบริสุทธิ์

4.4 ระบุเอพิโทปที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี

4.4.1 สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a- Δ 60N_VP1 ด้วยวิธี CTAB

เลี้ยงเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a ที่มียีน Δ 60N_VP1 ซึ่งได้จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ (ศรดา หวังอนุรักษ์กุล, 2558) ในอาหารเหลวที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก) ข้ามคืน จากนั้นเก็บเซลล์ 1.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วใส่ STET buffer (8% Sucrose, 5% TritonX-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8.0) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ตามด้วย Lysozyme ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเซลล์ไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 45 วินาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ดูดบัฟเฟอร์ออก ใส่ RNase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 5% Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสออก ละลายตะกอนด้วย 1.2 M NaCl ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ตามด้วย Chloroform ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จะสังเกตเห็นการแยกชั้นทั้งหมดสามชั้น ทำการดูดสารส่วนบนสุด ย้ายลงหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์แล้วเติม Isopropanol (v/v) ปริมาตรเท่ากับสารละลาย บ่มที่อุณหภูมิ -20° ซ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสออก แล้วล้างด้วย 75% Ethanol ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสออก แล้วปล่อยให้แห้งเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นละลายตะกอนด้วย DEPC-treat water ปริมาตร 35 ไมโครลิตร ตรวจสอบโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที

4.4.2 ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พหุริเมอร์

4.4.2.1 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วน Fragment 1 ถึง Fragment 4 (F1-F4)

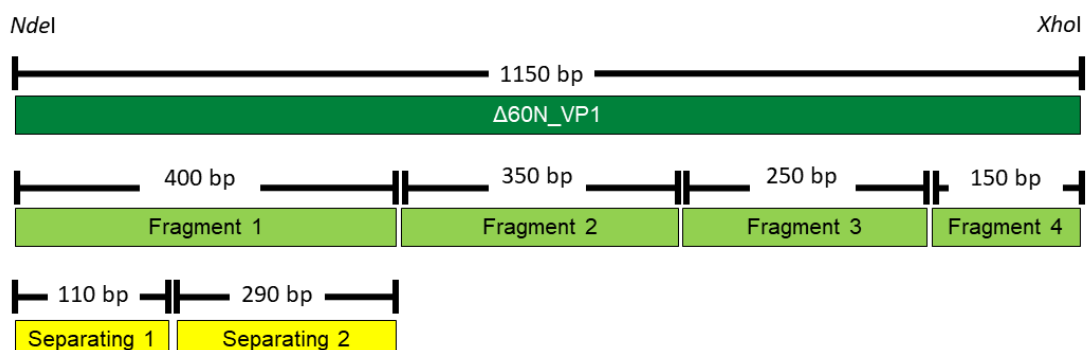
ทำการเพิ่มจำนวน Fragment 1 ถึง Fragment 4 ของยีน VP1 ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ (ตารางที่ 3.4) ผสมส่วนประกอบต่างๆ ในปฏิกิริยาดังนี้ DEPC-treat water, 1X High fidelity PCR Buffer, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 0.4 μ M Forward, 0.4 μ M Reverse, 1Unit High fidelity PCR enzyme โดยใช้พลาสมิด Δ 60N_VP1 ที่สกัดได้จากข้อ 4.4.1 เป็นต้นแบบในการเพิ่มยีน F1-F4 โดยตั้งโปรแกรม ดังตาราง 4.3 และตรวจสอบปริมาณยีนที่เพิ่มขึ้นโดย 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที

4.4.2.2 เพิ่มจำนวนชิ้นส่วน Separating 1 และ Separating 2 (S1-S2)

ทำการเพิ่มจำนวน S1 และ S2 ของชิ้นส่วน Fragment 1 ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ (ตารางที่ 3.5) ผสมส่วนประกอบต่างๆในปฏิกิริยาตามวิธีข้างต้น โดยใช้พลาสมิด Fragment 1 เป็นต้นแบบในการเพิ่มชิ้นส่วน S1 และ S2 จากนั้นนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ โดยตั้งโปรแกรมดังตาราง 4.3 และตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นโดย 1.5% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที

ตารางที่ 4.3 โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของชิ้นส่วน F1-F4 และ S1 และ S2

ชิ้นส่วน	Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final extension
F1	94° ซ/ 3 นาที	94° ซ/ 40 วินาที	53° ซ/ 25 วินาที	72° ซ/ 60 วินาที	72° ซ/ 10 นาที
F2					
F3					
F4			50° ซ/ 25 วินาที		
S1			52° ซ/ 25 วินาที	72° ซ/ 30 วินาที	
S2			50° ซ/ 25 วินาที	72° ซ/ 60 วินาที	
Cycles	-	-	34	-	-



รูปที่ 4.1 แสดงดีเอ็นเอที่แบ่งจากชิ้นส่วนของ $\Delta 60N_VP1$ จำนวน 6 ชิ้น (เอกราช สิทธิเดช)

4.4.2.3 ทำชิ้นส่วนดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วย Gel Extraction Kit (QIAGEN)

ละลายเจลที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วย QG buffer ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล ที่อุณหภูมิ 55 ° ซ จากนั้นใส่ Isopropanal (v/v) ปริมาตรเท่ากับน้ำหนักเจล นำสารละลายที่ได้ใส่ลงในคอลัมน์ และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ล้างคอลัมน์ด้วย QG buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยง 1 นาที ตามด้วย PE buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยง 1 นาที จากนั้นใส่ DEPC-treat water ปริมาตร 35 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 1 นาที ตรวจสอบโดย 1-1.5% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที

4.4.3 เชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์

ในการเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าสู่เวกเตอร์ จำเป็นต้องคำนวณให้มีอัตราส่วนที่เหมาะสม

$$\frac{\text{ng vector} \times \text{bp insert} \times 6 \text{ or } 3}{\text{bp vector}} = \text{ng insert}$$

รูปที่ 4.2 สูตรคำนวณเพื่อหาปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เหมาะสมต่อการเชื่อมเข้าสู่เวกเตอร์

4.4.3.1 เชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้ากับ pJET 1.2 blunt Cloning Vector

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณจากข้อ 4.4.2 เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pJET (Thermo Scientific) โดยผสมส่วนประกอบต่างๆในปฏิกิริยาให้มีปริมาณรวมเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ดังนี้ DEPC-treat water, ชิ้นส่วนยีน F1, F2, F3, F4, S1 และ S2, 2X Reaction buffer, DNA Blunting Enzyme บ่มที่อุณหภูมิ 70° ซ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมเวกเตอร์ pJET ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม และ T4 DNA Ligase บ่มต่อที่อุณหภูมิ 22°ซ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pJET-F1, F2, F3, F4, S1 และ S2 เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α (การทดลองที่ 4.1.1) และสกัดพลาสมิด (การทดลองที่ 4.4.1) ส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

หมายเหตุ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.4.3.2 เชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้ากับ pET28a (+) vector

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องจากข้อ 4.4.3.1 ตัดเอาชิ้นส่วนดีเอ็นเอออกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *XhoI* จากนั้นเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์ pET28a (+) (Invitrogen) ด้วยเอนไซม์ T4 ligase นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4° ซ ชั่วโมง จากนั้นทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a-F1, F2, F3, F4, S1 และ S2 เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α (การทดลองที่ 4.1.1) และสกัดพลาสมิด (การทดลองที่ 4.4.1) ส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

หมายเหตุ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

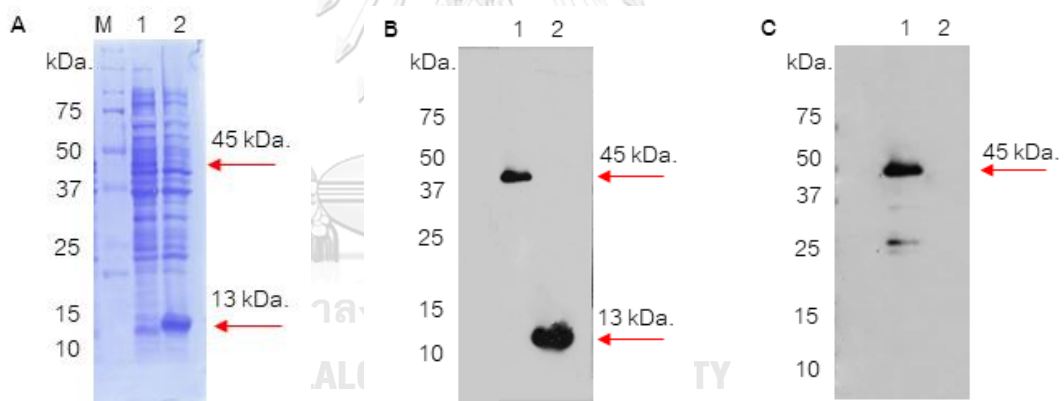
4.4.4 ระบุเอพิโทปต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องจากข้อ 4.4.3.2 ย้ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* Rosetta gami และชักนำให้เกิดการแสดงออก (การทดลองที่ 4.1) จากนั้นนำโปรตีนทั้ง 6 ชิ้น รวมถึงโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ มาใช้ระบุเอพิโทป ด้วยวิธี western blotting analysis โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่ผลิตได้เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ สังเกตแถบสัญญาณที่ปรากฏขึ้น

บทที่ 5 ผลการทดลอง

5.1 ผลการชักนำการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$

เมื่อนำรีคอมบิแนนท์โคลน $\Delta 60N_VP1$ ที่ได้จากงานวิจัยก่อนหน้า มาชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย IPTG เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นตรวจติดตามด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His monoclonal antibody จากผลการทดลองพบการแสดงออกของโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ และโปรตีนควบคุมที่มี Histidine-Tag (รูป 5.1A) ซึ่งปรากฏแถบสัญญาณต่อ Anti-His monoclonal antibody มีขนาดประมาณ 45 และ 13 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (รูป 5.1B) จากนั้นใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ พบโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ปรากฏแถบสัญญาณต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี มีขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน โดยโปรตีนควบคุมไม่ปรากฏแถบสัญญาณต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (รูป 5.1C) แสดงว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ มีความจำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ และไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนอื่นที่มี Histidine-Tag

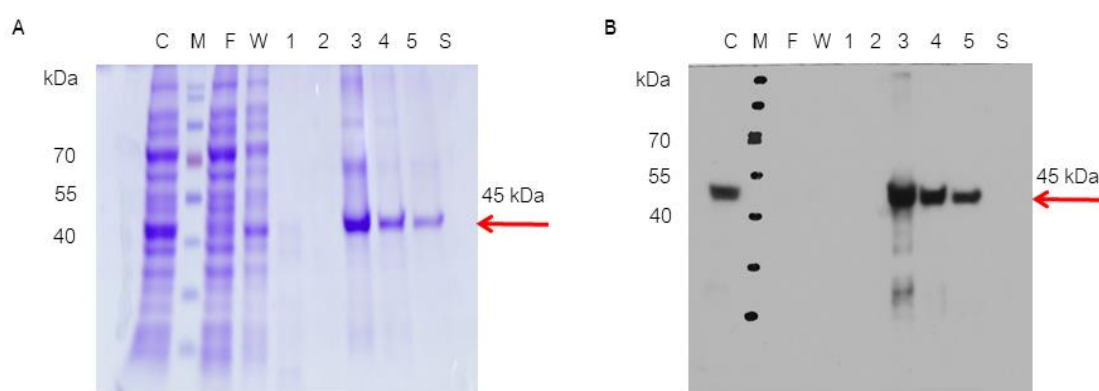


รูปที่ 5.1 ผลการวิเคราะห์ด้วย 13% SDS-PAGE (A) Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His monoclonal antibody (B) โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (C) อัตราส่วน 1:5,000 ของรีคอมบิแนนท์โคลนถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

- | | |
|-------|--|
| เลน M | Protein Marker (Thermo Scientific) |
| เลน 1 | รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a- $\Delta 60N_VP1$ |
| เลน 2 | รีคอมบิแนนท์โปรตีนควบคุมที่มี Histidine-Tag |

5.2 ผลการทำรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ให้บริสุทธิ์

จากผลการทดลองพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย PCE elution buffer ที่มีความเข้มข้นของ Imidazole ตั้งแต่ 100, 200 และ 300 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (รูปที่ 5.2A เลน 3-5) ซึ่งสอดคล้องกับผล Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His monoclonal antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ โดยปรากฏแถบสัญญาณ ขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน (รูปที่ 5.2B เลน 3-5) จากผลการทดลองพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ บริสุทธิ์ถูกชะออกมาอยู่ใน fraction ของ PCE ที่มี Imidazole ความเข้มข้น 200 และ 300 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 5.2 เลน 4 และ 5)



รูปที่ 5.2 ผลการวิเคราะห์ด้วย 13% SDS-PAGE (A) Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His monoclonal antibody (B) ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์

- เลน C Crude protein (control)
 เลน M Protein Marker (Thermo scientific)
 เลน F Flow through
 เลน W Washing
 เลน 1 PCE ที่มีความเข้มข้นของ Imidazole ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์
 เลน 2 PCE ที่มีความเข้มข้นของ Imidazole ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์
 เลน 3 PCE ที่มีความเข้มข้นของ Imidazole ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์
 เลน 4 PCE ที่มีความเข้มข้นของ Imidazole ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์
 เลน 5 PCE ที่มีความเข้มข้นของ Imidazole ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์
 เลน S Strip buffer

5.3 ผลวัดความเข้มข้นของโปรตีนบริสุทธิ์โดยวิธี Bradford assay

นำสารละลายโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ บริสุทธิ์มากำจัดสาร Imidazole และ Sakosyl ออกด้วยวิธี Dialysis (การทดลองที่ 4.2.5) จากนั้นนำโปรตีนบริสุทธิ์มาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay (การทดลองที่ 4.2.6) วัดผลด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (OD_{595}) ใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) ที่ระดับความเข้มข้น 7.8, 15.6, 31.2, 62.5 และ 125 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เป็นสารมาตรฐาน (standard) และใช้ 1X PBS buffer เป็น Blank โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ (ตารางที่ 5.1)

ตารางที่ 5.1 แสดงผลการวัดความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ บริสุทธิ์ ด้วยวิธี Bradford assay

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร			ค่าเฉลี่ย	ค่าเฉลี่ย - ค่าเฉลี่ย Blank
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
Blank	-	0.302	0.321	0.34	0.321	0
Protein Standard (BSA)	7.8	0.339	0.379	0.405	0.374	0.053
	15.6	0.366	0.365	0.422	0.384	0.063
	31.2	0.397	0.383	0.346	0.372	0.051
	62.5	0.430	0.440	0.430	0.433	0.112
	125	0.591	0.596	0.605	0.597	0.276
โปรตีน $\Delta 60N_VP1$	-	0.436	0.421	0.475	0.444	0.123

จากนั้นนำค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดความเข้มข้นโปรตีน สร้างกราฟมาตรฐานซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีน (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (แกน Y) ซึ่งได้สมการเส้นตรงดังนี้ $y = 0.0019x + 0.0237$ และได้ค่า Coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.9522 นำค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนแอนติเจน แทนค่า y ในสมการดังกล่าว ดังนั้นความเข้มข้นของโปรตีนแอนติเจน สำหรับใช้ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลอง จึงเท่ากับ 52.26 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

5.4 ผลการหาความเข้มข้นของแอนติเจนที่เหมาะสมต่อการหาโมโนโคลนอลแอนติบอดี

นำแอนติเจน $\Delta 60N_VP1$ ทำการเจือจางด้วย PBS ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20, 80 และ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นตั้งแอนติเจนทั้ง 3 ความเข้มข้น ตามการทดลองที่ 4.3.2.1 โดยใช้ซีรัมที่เก็บจากหนูเม้าส์จำนวน 4 ตัว ก่อนทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรก เป็นซีรัมก่อน (pre) และใช้ซีรัมที่เก็บจากหนูเม้าส์ หลังทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งที่สอง เป็นซีรัมหลัง (post) ได้ผลดังตารางในภาคผนวก จากผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้ปริมาณแอนติเจนทั้ง 3 ความเข้มข้น จะให้ค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกันในแต่ละระดับการเจือจางของซีรัม ดังนั้น ทางผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้แอนติเจนที่มีความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ระดับกลาง เพื่อใช้สำหรับตรวจติดตามแอนติบอดีในการทดลองขั้นต่อไป

5.5 ผลการประยุกต์ใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ สำหรับผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ เพื่อใช้เป็นแอนติเจนสำหรับการฉีดกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีในหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/c จำนวน 4 ตัว ฉีดกระตุ้นทั้งหมด 4 ครั้ง โดยผสมแอนติเจนกับ Adjuvant อัตราส่วน 1:1 ทำการเก็บตัวอย่างเลือดทั้งก่อนและหลังฉีดกระตุ้น และนำซีรัมที่ได้ไปทดสอบด้วยวิธี ELISA (การทดลองที่ 4.3.3) จากนั้นคัดเลือกหนูสองตัวที่ให้ผลการผลิตแอนติบอดีที่สูงที่สุด ได้แก่ หนูเบอร์ 2 และหนูเบอร์ 3 ทำการการุณยฆาต เพื่อเก็บม้ามมาหลอมรวมกับ myeloma cell จนกลายเป็นเซลล์ลูกผสม (Hybridoma cell) เลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมา 2-3 สัปดาห์ จึงเริ่มนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาทดสอบหาความจำเพาะต่อแอนติเจน $\Delta 60N_VP1$ ด้วยวิธี Indirect-ELISA จากผลการทดลองพบว่า ในช่วง 3 สัปดาห์แรกพบโพลีโคลนอลแอนติบอดี ที่ให้ผลเป็นบวกทั้งสิ้น 60 โคลน และทำการเจือจางเซลล์ด้วยวิธี Limiting dilution เพื่อกระจายเซลล์ให้ได้เซลล์เดี่ยว จนเกิดเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดี จากนั้นเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ มาหาไอโซไทป์ และหาความไว (sensitivity) (การทดลองที่ 4.3.5, 4.3.6) ผลการทดลองพบ โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจน $\Delta 60N_VP1$ ทั้งหมด 6 โคลน ได้แก่ โคลนหมายเลข 1, 2, 3, 7, 21 และ 29 (ตารางที่ 5.2) จากนั้นจึงนำแอนติบอดีทั้ง 6 โคลน ไปหาไอโซไทป์

ตารางที่ 5.2 แสดงผลการหาโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแอนติเจน $\Delta 60N_VP1$

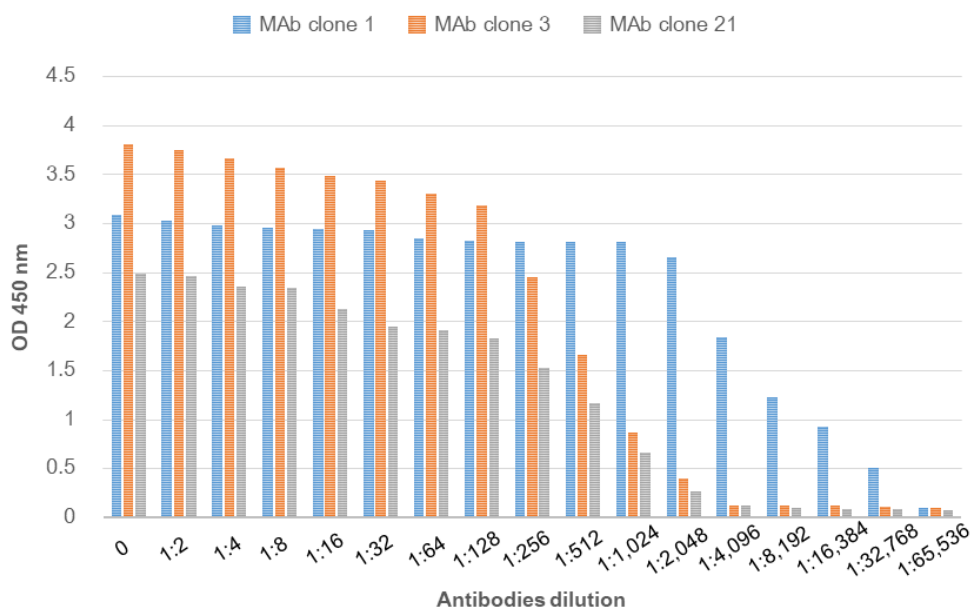
รหัสโคลน	หมายเลขโคลน	ค่าการดูดกลืนแสง OD 450 _{nm}
6-5B-5B-12F-10A (23)	1	3.958
2D-A8-C4	2	0.932
3-F1-H3	3	3.516
7-E5-A5-F4	7	1.943
21-A11-B8	21	2.458
29G-E1-D5-G3	29	3.623

จากผลการหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 6 โคลน พบว่า โคลนที่ 1 เป็นกลุ่มของ IgG_{2a}, โคลนที่ 3 เป็นกลุ่มของ IgG_{2b}, โคลนที่ 21 เป็นกลุ่มของ IgG₁, โคลนที่ 2 และ 7 เป็นกลุ่มของ IgM และโคลนที่ 29 เป็นกลุ่มของ IgG_{2b} หรือ IgM (ตารางที่ 5.3)

ตารางที่ 5.3 แสดงผลการหาไอโซไทป์ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

รหัสโคลน	หมายเลขโคลน	Isotype	
6-5B-5B-12F-10A (23)	1	IgG _{2a}	K
2D-A8-C4	2	IgM	λ
3-F1-H3	3	IgG _{2b}	K
7-E5-A5-F4	7	IgM	λ
21-A11-B8	21	IgG ₁	K
29G-E1-D5-G3	29	IgG _{2b}	λ
		IgM	K

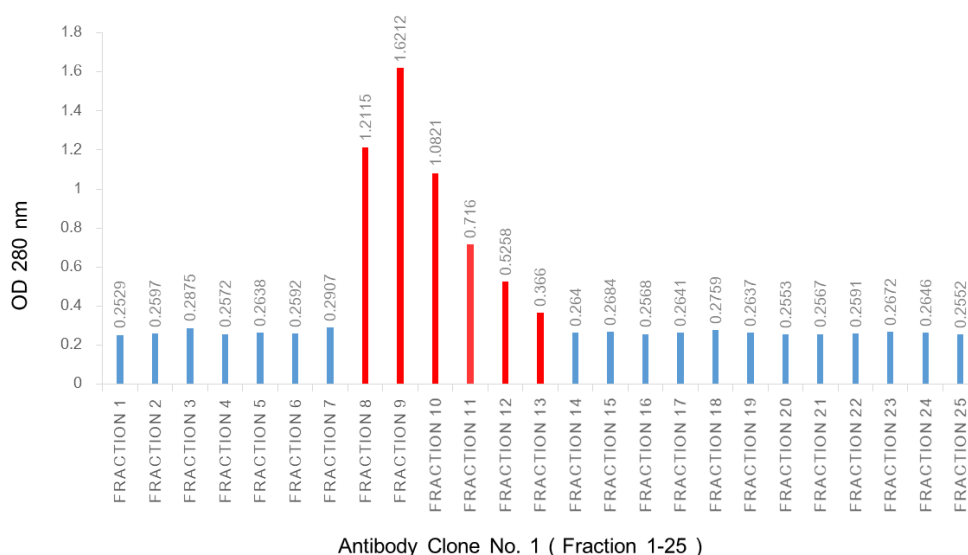
ผู้วิจัยได้คัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีคลาส IgG ได้แก่ โคลนที่ 1, 3 และ 21 มาทดสอบหาความไว (sensitivity test) ผลการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 3 โคลน พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 1 ให้ค่าความไวสูงที่สุด โดยสามารถเจือจางแอนติบอดีได้ถึง 1:32,768 ในขณะที่แอนติบอดีโคลนที่ 3 และ 21 สามารถเจือจางได้ถึง 1:2,048 ตามลำดับ (รูปที่ 5.3)



รูปที่ 5.3 กราฟค่าความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีจากโคลนที่ 1 (แกนสีฟ้า), โคลนที่ 3 (แกนสีส้ม) และโคลนที่ 21 (แกนสีเทา) ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเจือจางของแอนติบอดี (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (แกน Y)

5.6 ผลการทำโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โปรตีนจี

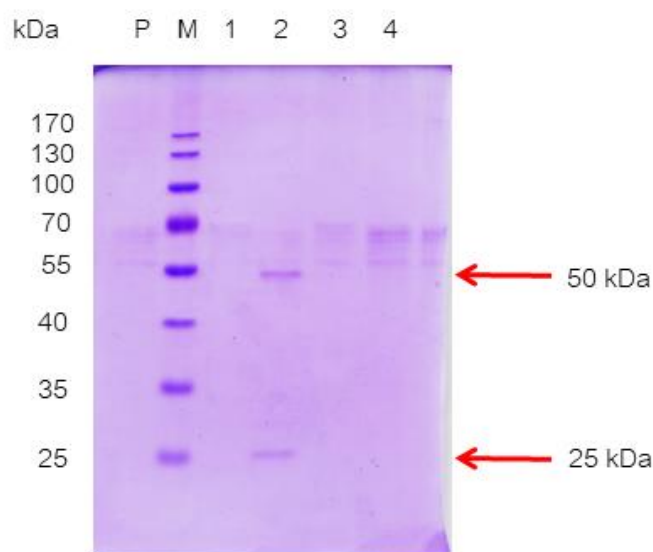
นำอาหารเลี้ยงเซลล์โคลนที่ 1 มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้โครมาโทกราฟีแบบสมรรถภาค (affinity chromatography) ภายในคอลัมน์ประกอบด้วยโปรตีน G sepharose เนื่องจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 1 มีไอโซไทป์เป็น IgG_{2a} ทำให้มีสมรรถภาพในการจับกับโปรตีนจีในคอลัมน์ได้สูง และโมโนโคลนอลแอนติบอดี จะถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย Buffer A (pH 2.7) แล้วนำแต่ละ fraction ไปวัด UV 280 นาโนเมตร เพื่อหาแอนติบอดีที่ถูกชะออกมา จากกราฟแอนติบอดีถูกชะออกมาจากคอลัมน์ ปรากฏใน fraction 8 - fraction 13 (รูปที่ 5.4)



Antibody Clone No. 1 (Fraction 1-25)

รูปที่ 5.4 กราฟแสดงผลของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 1 ที่ทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง fraction ที่ชะแอนติบอดีออกจากคอลัมน์ (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (แกน Y)

จากนั้นทำการรวมแอนติบอดี fraction 8-13 เข้าด้วยกัน แล้วนำไปยืนยันผลด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting analysis ผลการทดลองปรากฏแถบโปรตีนของสาย heavy chain ขนาดประมาณ 50 กิโลดาลตัน และแถบโปรตีนของสาย light chain ขนาดประมาณ 25 กิโลดาลตัน (รูปที่ 5.5 เลน 2)



รูปที่ 5.5 ผลการวิเคราะห์ด้วย 13% SDS-PAGE ของโมนโคลอนอลแอนติบอดีโคลนที่ 1 ที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โปรตีนจี แต่ละเลนมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

เลน P โมนโคลอนอลแอนติบอดีก่อนทำให้บริสุทธิ์

เลน M Protein Marker (Thermo scientific)

เลน 1 Flow through

เลน 2 โมนโคลอนอลแอนติบอดีโคลนที่ 1 ที่ทำให้บริสุทธิ์

เลน 3 อาหารเลี้ยงไฮบริโดมาเซลล์ serum free

เลน 4 อาหารเลี้ยงไฮบริโดมาเซลล์ที่มี 10% FBS

5.7 ผลการวัดความเข้มข้นของแอนติบอดีบริสุทธิ์โดยวิธี BCA

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีบริสุทธิ์มาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี BCA (การทดลองที่ 4.3.8) วัดผลด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) ที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐาน (standard) และใช้ 1X PBS buffer เป็น Blank โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ (ตารางที่ 5.4)

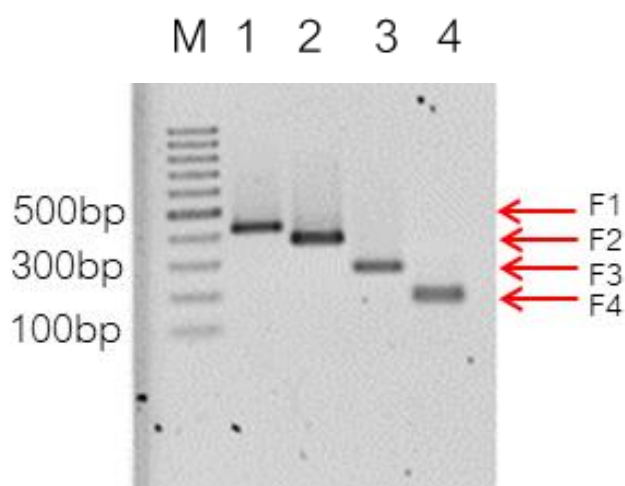
ตารางที่ 5.4 แสดงความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีบริสุทธิ์ ด้วยวิธี BCA

ตัวอย่าง	ความเข้มข้น (mg/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร		ค่าเฉลี่ย	ค่าเฉลี่ย - ค่าเฉลี่ย Blank
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2		
Blank	-	0.1220	0.1260	0.1240	0
Protein Standard (BSA)	0.1	0.2813	0.2793	0.2803	0.1563
	0.2	0.4042	0.4232	0.4137	0.2897
	0.4	0.6494	0.6767	0.6631	0.5391
	0.6	0.8825	0.8771	0.8798	0.7558
	0.8	1.0891	1.1575	1.1233	0.9993
	1.0	1.2853	1.3440	1.3146	1.1906
MAB No.1	-	1.1459	1.0802	1.1130	0.9892

จากนั้นนำค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัดความเข้มข้นแอนติบอดีสร้างกราฟมาตรฐานซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอนติบอดี (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (แกน Y) ซึ่งได้สมการเส้นตรงดังนี้ $y = 1.1537x + 0.0591$ และได้ค่า Coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.9982 นำค่าการดูดกลืนแสงของแอนติบอดีแทนค่า y ในสมการดังกล่าว ดังนั้นความเข้มข้นของแอนติบอดีจึงเท่ากับ 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5.8 ผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พหุริเมอเรส (PCR) ชิ้นส่วน Fragment 1- Fragment 4 (F1-F4)

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a- Δ 60N_VP1 ที่สกัดได้ เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ตั้งโปรแกรมดังตาราง 4.3 ตรวจสอบโดยวิธี อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟเรซิส ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที จากผลการรันเจลโดยใช้ 1% อะกาโรสเจล พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ F1-F4 มีขนาดประมาณ 400, 350, 250 และ 150 คู่เบส ตามลำดับ (รูปที่ 5.6)



รูปที่ 5.6 ผลการวิเคราะห์ด้วย 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลา 60 นาที

เลน M 100 pb Marker (Thermo scientific)

เลน 1 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ Fragment 1 (F1)

เลน 2 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ Fragment 2 (F2)

เลน 3 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ Fragment 3 (F3)

เลน 4 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ Fragment 4 (F4)

5.9 ผลการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pJET- (F1-F4)

นำชิ้นส่วนสารพันธุกรรม F1-F4 ที่เพิ่มปริมาณจากข้อ 4.4.2.1 เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pJET (Thermo Scientific) จากนั้นทำการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pJET-F1, F2, F3 และ F4 เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α (การทดลองที่ 4.1.1) และสกัดพลาสมิด (การทดลองที่ 4.4.1) ส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ผลการทดลอง แสดงลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (ควบคุม) พบว่าชิ้นส่วน F1-F4 มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับตัวควบคุม 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงผลในรูปที่ 5.7-5.10

```

*      20      *      40      *      60      *      80
60N-VP1 : LPNPQSTMTIRFQGIIFLTEGLILPKNSTAGGYADHLYGARVAKISVNLKEFLASMNLYVSKIGGPIAGELIADGSQS : 80
Fragment 1 : LPNPQSTMTIRFQGIIFLTEGLILPKNSTAGGYADHLYGARVAKISVNLKEFLASMNLYVSKIGGPIAGELIADGSQS : 80

*      100     *      120     *      140     *      160
60N-VP1 : QAAQNWPNCWLPDNNVPSATPSAWWRWALMMMOPTDSCRFFNHPKQMTLQDMGRMFGGWHLFRHIETRFQLLATKNEGS : 160
Fragment 1 : QAAQNWPNCWLPDNNVPSATPSAWWRWALMMMOPTDSCRFFNHPKQMTLQDM----- : 133

*      180     *      200     *      220     *      240
60N-VP1 : FSPVASLLSQGEYLTRRDDVKYSSDHQNRWRKGEQFMTGGIAYATGKMRPDEQQYPAMPDPPIITATTAQGTQVRCMNS : 240
Fragment 1 : ----- : -

*      260     *      280     *      300     *      320
60N-VP1 : TQAWWSWDTYMSFATLTALGAQWSFPPGQRSVSRSSFNHHKARGAGDPKGRWHTLVPLGTETITDSYMSAPASELDTNF : 320
Fragment 1 : ----- : -

*      340     *      360     *      380
60N-VP1 : FTLYVAQGTNKSQQYKFGTATYALKEFVMKSDAWAVVRVQSVWQLGNRQRPYPWDVNWANSTMYWGSQP : 389
Fragment 1 : ----- : -

```

รูปที่ 5.7 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Fragment 1 ที่เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pJET1.2 blunt cloning kit เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (ควบคุม)

```

*           20           *           40           *           60           *           80
60N-VP1    : LPNPQSTMTIRFQGIIFLTEGLILPKNSTAGGYADHLYGARVAKISVNLKEFLLASMNLTYSKIGGPIAGELIADGSQS : 80
Fragment 2 : -----: -

*           100          *           120          *           140          *           160
60N-VP1    : QAAQNWPNCWLPDNNVPSATPSAWRWALMMMQPTDSCRFFNHKQMTLQDMGRMFGGWHLFRHIETRFQLLATKNEGS : 160
Fragment 2 : -----GRMFGGWHLFRHIETRFQLLATKNEGS : 27


*           180          *           200          *           220          *           240
60N-VP1    : FSPVASLLSQGEYLTRRDDVKYSSDHQNRWRKGEQPM TGGIAYATGKMRPDEQQYPAMPDPPIITATTAQGTQVRCMNS : 240
Fragment 2 : FSPVASLLSQGEYLTRRDDVKYSSDHQNRWRKGEQPM TGGIAYATGKMRPDEQQYPAMPDPPIITATTAQGTQVRCMNS : 107

*           260          *           280          *           300          *           320
60N-VP1    : TQAWWSWDTYMSFATLTALGAQWSFPPGQRSVSRRSFNHKKARGAGDPKQRWHTLVPLGTETITDSYMSAPASELDTNF : 320
Fragment 2 : TQAWWSWDTY-----: 117

*           340          *           360          *           380
60N-VP1    : FTLYVAQGTNKSQQYKFGTATYALKEPVMKSDAWAVVRVQSVWQLGNRQRPYPWDVNWANSTMYWGSQP : 389
Fragment 2 : -----: -

```

รูปที่ 5.8 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Fragment 2 ที่เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pJET1.2 blunt cloning kit เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (ควบคุม)



```

*           20           *           40           *           60           *           80
60N-VP1    : LPNPQSTMTIRFQGIIFLTEGLILPKNSTAGGYADHLYGARVAKISVNLKEFLLASMNLTYSKIGGPIAGELIADGSQS : 80
Fragment 3 : -----: -

*           100          *           120          *           140          *           160
60N-VP1    : QAAQNWPNCWLPDNNVPSATPSAWRWALMMMQPTDSCRFFNHKQMTLQDMGRMFGGWHLFRHIETRFQLLATKNEGS : 160
Fragment 3 : -----: -

*           180          *           200          *           220          *           240
60N-VP1    : FSPVASLLSQGEYLTRRDDVKYSSDHQNRWRKGEQPM TGGIAYATGKMRPDEQQYPAMPDPPIITATTAQGTQVRCMNS : 240
Fragment 3 : -----: -

*           260          *           280          *           300          *           320
60N-VP1    : TQAWWSWDTYMSFATLTALGAQWSFPPGQRSVSRRSFNHKKARGAGDPKQRWHTLVPLGTETITDSYMSAPASELDTNF : 320
Fragment 3 : -----MSFATLTALGAQWSFPPGQRSVSRRSFNHKKARGAGDPKQRWHTLVPLGTETITDSYMSAPASELDTNF : 71

*           340          *           360          *           380
60N-VP1    : FTLYVAQGTNKSQQYKFGTATYALKEPVMKSDAWAVVRVQSVWQLGNRQRPYPWDVNWANSTMYWGSQP : 389
Fragment 3 : FTLYVAQGTNKSQ-----: 86

```

รูปที่ 5.9 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Fragment 3 ที่เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pJET1.2 blunt cloning kit เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (ควบคุม)

```

*           20           *           40           *           60           *           80
60N-VP1 : LPNPQSTMTIRFQGIIFLTEGLILPKNSTAGGYADHLYGARVAKISVNLKEFLASMNLTYSKIGGPIAGELIADGSQS : 80
Fragment 4 : -----: -

*           100          *           120          *           140          *           160
60N-VP1 : QAAQNWPNCWLPDNNVPSATPSAWRWALMMMQPTDSCRFFNHPKQMTLQDMGRMFGGWHLFRHIETRFQLLATKNEGS : 160
Fragment 4 : -----: -

*           180          *           200          *           220          *           240
60N-VP1 : FSPVASLLSQGEYLTRRDDVKYSSDHQNRWRKGEQPMGGIAYATGKMRPDEQQYPAMPDPFPIITATTAQGTQVRCMNS : 240
Fragment 4 : -----: -

*           260          *           280          *           300          *           320
60N-VP1 : TQAWWSWDTYMSFATLTALGAQWSFPPGQRSVSRRSFNHHKARGAGDPKGRWHTLVPLGTETITDSYMSAPASELDTNF : 320
Fragment 4 : -----: -

*           340          *           360          *           380
60N-VP1 : FTLYVAQGTNKSQYKFGTATYALKEPVMKSDAWAVVRVQSVWQLGNRORPYPWDVNWANSTMYWGSQP : 389
Fragment 4 : -----QYKFGTATYALKEPVMKSDAWAVVRVQSVWQLGNRORPYPWDVNWANSTMYWGSQP : 56

```

รูปที่ 5.10 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Fragment 4 ที่เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pJET1.2 blunt cloning kit เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (ควบคุม)



5.10 ผลการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a- (F1-F4)

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pJET-F1, F2, F3, F4 ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้อง ตัดเอาชิ้นส่วนสารพันธุกรรมออกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *XhoI* ทำการเชื่อมชิ้นส่วนสารพันธุกรรมเข้ากับเวกเตอร์ pET28a (+) (Invitrogen) ด้วยเอนไซม์ T4 ligase จากนั้นทำการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้ง 4 ตัว เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α (การทดลองที่ 4.1.1) และสกัดพลาสมิด (การทดลองที่ 4.4.1) ส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโน เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ แสดงผลในรูปที่ 5.11-5.14

```

      *      20      *      40      *      60      *      80
 $\Delta 60N\_VP1$  : MGS SHHHHHSSGLVPRGSHMLPNPQSTMTIRFQGIIFLTEGLILPKNSTAGGYADHLYGARVAKISVNLKEFLLASMNLI : 80
Fragment 1 : MGS SHHHHHHSGLVPRGSHMLPNPQSTMTIRFQGIIFLTEGLILPKNSTAGGYADHLYGARVAKISVNLKEFLLASMNLI : 80

      *      100     *      120     *      140     *      160
 $\Delta 60N\_VP1$  : TYVSKIGGPIAGELIADGSQSQAQNWPNCWLPDNNVPSATPSAWWRWALMMMQPPTDSCRFFNHHPKQMTLQDMGRMFGG : 160
Fragment 1 : TYVSKIGGPIAGELIADGSQSQAQNWPNCWLPDNNVPSATPSAWWRWALMMMQPPTDSCRFFNHHPKQMTLQDM----- : 154

      *      180     *      200     *      220     *      240
 $\Delta 60N\_VP1$  : WHLFRHIETRFQLLATKNEGSFSPVASLLSQGEYLTRDDVKYSSDHQNRWRKGEQPMTEGGIAYATGKMRPDEQQYPAMP : 240
Fragment 1 : ----- : -

      *      260     *      280     *      300     *      320
 $\Delta 60N\_VP1$  : PDPPIIITATTAQGTQVRCMNSTQAWWSWDTYMSFATLTALGAQWSFPPGQRSVSRFSFNHKKARGAGDFKGRWHTLVPL : 320
Fragment 1 : ----- : -

      *      340     *      360     *      380     *      400
 $\Delta 60N\_VP1$  : GTETITDSYMSAPASELDTNFFTLTYVAQGTNKSQQYKFGTATYALKEPVMKSDAWAVVRVQSVWQLGNRQRYPWDVNWA : 400
Fragment 1 : ----- : -

      *
 $\Delta 60N\_VP1$  : NSTMYWGSQP- : 410
Fragment 1 : ----- : -

```

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5.11 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Fragment 1 ที่เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pET28a เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (ควบคุม)

```

      *          20          *          40          *          60          *          80
Δ60N_VP1 : MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLPNPQSTMTIRFQGIIFLTEGLILPKNSTAGGYADHLYGARVAKISVNLKEFLASMNL : 80
Fragment 2 : MGSSHHHHHSSGLVPRGSH----- : 20

      *          100         *          120         *          140         *          160
Δ60N_VP1 : TYVSKIIGGPIAGELIADGSQSQAQNWPNCWLPDNNVPSATPSAWRWALMMMQPTDSCRFFNHKQMTLQDMGRMFGG : 160
Fragment 2 : -----GRMFGG : 26

      *          180         *          200         *          220         *          240
Δ60N_VP1 : WHLFRHIETRFQLLATKNEGSFSPVASLLSQGEYLTRRDDVKYSSDHQNRWRKGEQPMTGGIAYATGKMRPDEQQYPAMP : 240
Fragment 2 : WHLFRHIETRFQLLATKNEGSFSPVASLLSQGEYLTRRDDVKYSSDHQNRWRKGEQPMTGGIAYATGKMRPDEQQYPAMP : 106

      *          260         *          280         *          300         *          320
Δ60N_VP1 : PDPPIITATTAQGTQVRCMNSTQAWWSWDTYMSFATLTALGAQWSFPPGQRSVSRRSFNHHKARGAGDPKQRWHTLVPL : 320
Fragment 2 : PDPPIITATTAQGTQVRCMNSTQAWWSWDTY----- : 137

      *          340         *          360         *          380         *          400
Δ60N_VP1 : GTETITDSYMSAPASELDTNFFTLVAQGTNKSQYKFGTATYALKEPVMKSDAWAVVRVQSVWQLGNRQRPYPWDVNW : 400
Fragment 2 : ----- : -

      *
Δ60N_VP1 : NSTMYWGSQP- : 410
Fragment 2 : ----- : -

```

รูปที่ 5.12 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Fragment 2 ที่เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pET28a เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Δ60N_VP1 (ควบคุม)

```

      *          20          *          40          *          60          *          80
Δ60N_VP1 : MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLPNPQSTMTIRFQGIIFLTEGLILPKNSTAGGYADHLYGARVAKISVNLKEFLASMNL : 80
Fragment 3 : MGSSHHHHHSSGLVPRGSH----- : 20

      *          100         *          120         *          140         *          160
Δ60N_VP1 : TYVSKIIGGPIAGELIADGSQSQAQNWPNCWLPDNNVPSATPSAWRWALMMMQPTDSCRFFNHKQMTLQDMGRMFGG : 160
Fragment 3 : ----- : -

      *          180         *          200         *          220         *          240
Δ60N_VP1 : WHLFRHIETRFQLLATKNEGSFSPVASLLSQGEYLTRRDDVKYSSDHQNRWRKGEQPMTGGIAYATGKMRPDEQQYPAMP : 240
Fragment 3 : ----- : -

      *          260         *          280         *          300         *          320
Δ60N_VP1 : PDPPIITATTAQGTQVRCMNSTQAWWSWDTYMSFATLTALGAQWSFPPGQRSVSRRSFNHHKARGAGDPKQRWHTLVPL : 320
Fragment 3 : -----MSFATLTALGAQWSFPPGQRSVSRRSFNHHKARGAGDPKQRWHTLVPL : 69

      *          340         *          360         *          380         *          400
Δ60N_VP1 : GTETITDSYMSAPASELDTNFFTLVAQGTNKSQYKFGTATYALKEPVMKSDAWAVVRVQSVWQLGNRQRPYPWDVNW : 400
Fragment 3 : GTETITDSYMSAPASELDTNFFTLVAQGTNKSQ----- : 103

      *
Δ60N_VP1 : NSTMYWGSQP- : 410
Fragment 3 : ----- : -

```

รูปที่ 5.13 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Fragment 3 ที่เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pET28a เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Δ60N_VP1 (ควบคุม)

```

      *      20      *      40      *      60      *      80
Δ60N_VP1 : MGSSEHHHHSSGLVPRGSHMLPNPQSTMTIRFQGIIFLTEGLILPKNSTAGGYADHLYGARVAKISVNLKEFLASMNL : 80
Fragment 4 : MGSSEHHHHSSGLVPRGSHM----- : 21

      *      100     *      120     *      140     *      160
Δ60N_VP1 : TYVSKIGGPIAGELIADGSQSQAQNWPNCLPLDNNVPSATPSAWRWALMMMQPTDSCRFFNHPKQMTLQDMGRMFGG : 160
Fragment 4 : ----- : -

      *      180     *      200     *      220     *      240
Δ60N_VP1 : WHLFRHIETRFQLLATKNEGSFSPVASLLSQGEYLTRRDDVKYSSDHQNRWRKGEQPMTGGIAYATGKMRPDEQQYPAMP : 240
Fragment 4 : ----- : -

      *      260     *      280     *      300     *      320
Δ60N_VP1 : PDPPIITATTAQGTQVRCMNSTQAWWSWDTYMSFATLTALGAQWSFPPGQRSVSRFSNHHKARGAGDPKGRWHTLVPL : 320
Fragment 4 : ----- : -

      *      340     *      360     *      380     *      400
Δ60N_VP1 : GTETITDSYMSAPASELDTNFFTLVVAQGTNKSQYKFGTATYALKEPVMKSDAWAVVRVQSVWQLGNRQRPYPWDVNW : 400
Fragment 4 : -----QYKFGTATYALKEPVMKSDAWAVVRVQSVWQLGNRQRPYPWDVNW : 67

      *
Δ60N_VP1 : NSTMYWGSQP- : 410
Fragment 4 : NSTMYWGSQP- : 77

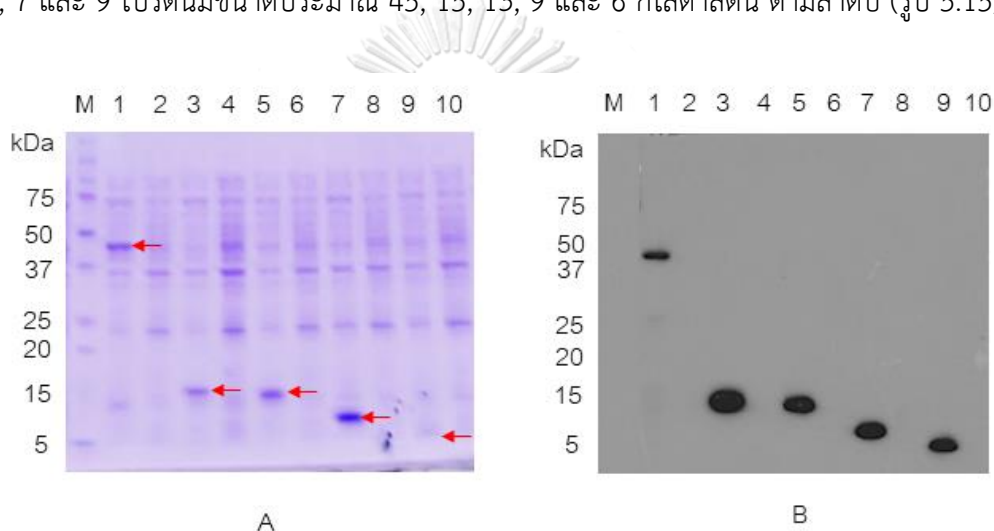
```

รูปที่ 5.14 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Fragment 4 ที่เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pET28a เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Δ60N_VP1 (ควบคุม)

ผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า รีคอมบิแนนท์ pET28a-F1, F2, F3 และ F4 ที่สร้างขึ้นมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของรีคอมบิแนนท์โปรตีน Δ60N_VP1 ดังนั้น รีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้ง 4 ตัว จึงเหมาะสมในการเลือกนำไปใช้ในการแสดงออก เพื่อหาเอพิโทปที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการทดลองถัดไป

5.11 ผลการระบุเอพิโทปต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี

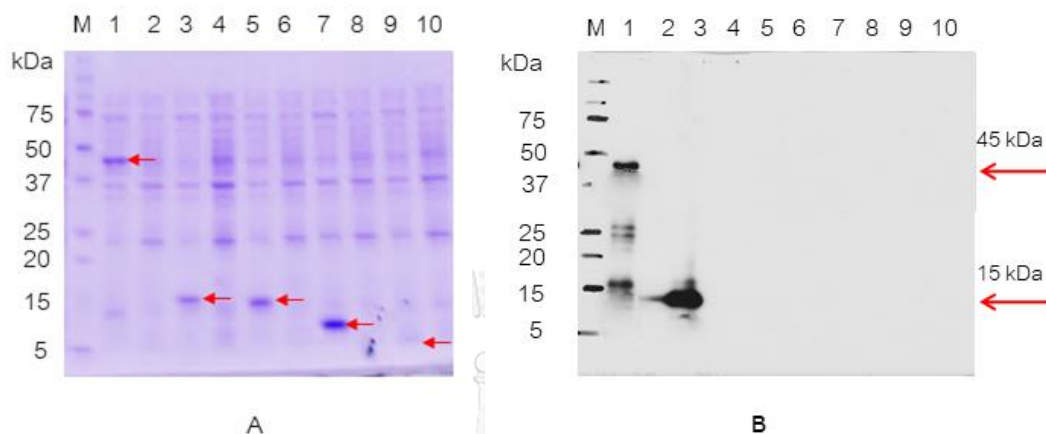
นำรีคอมบิแนนท์โคลน pET28a-F1, F2, F3 และ F4 ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้อง ย้ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* Rosetta gami และชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย IPTG จากนั้นติดตามผลด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His monoclonal antibody และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้ง 4 โคลน ได้แก่ โคลนที่ 1, 3, 21 และ 29 เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 1, 3, 21 ใช้อัตราส่วน 1: 5,000 ส่วนโคลนที่ 29 ใช้อัตราส่วน 1:500 จากผลการทดลองพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (ควบคุม), F1-F4 ซึ่งมี Histidine-Tag ปรากฏแถบสัญญาณต่อ Anti-His monoclonal antibody แสดงให้เห็นในเลนที่ 1, 3, 5, 7 และ 9 โปรตีนมีขนาดประมาณ 45, 15, 13, 9 และ 6 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (รูป 5.15)



รูปที่ 5.15 ผลการวิเคราะห์ด้วย 13% SDS-PAGE (A) Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His monoclonal antibody (B) อัตราส่วน 1:2,500 ของรีคอมบิแนนท์โคลนถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดย Lane 1, 3, 5, 7, 9 เป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกและ Lane 2, 4, 6, 8, 10 เป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออก

เลน M	Protein Marker (Bio-Rad)
เลน 1, 2	รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a- $\Delta 60N_VP1$ (control)
เลน 3, 4	รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a-F1 (Fragment 1)
เลน 5, 6	รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a-F2 (Fragment 2)
เลน 7, 8	รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a-F3 (Fragment 3)
เลน 9, 10	รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a-F4 (Fragment 4)

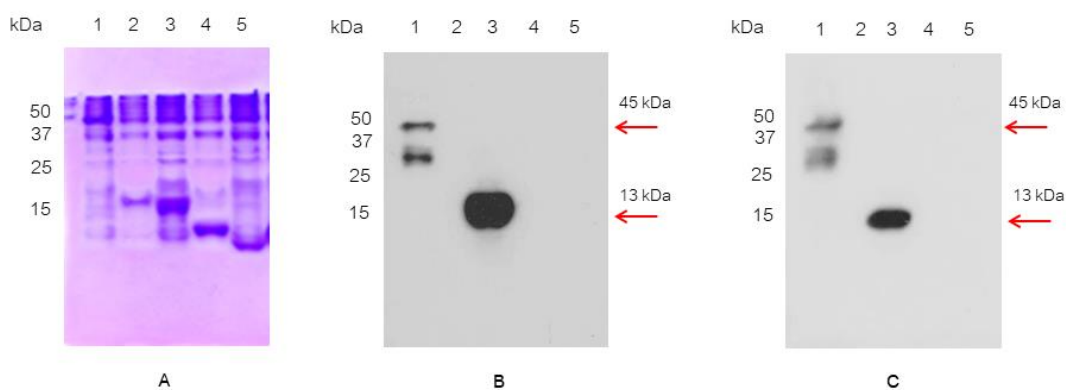
นอกจากนี้ยังพบรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (ควบคุม) และรีคอมบิแนนท์โปรตีน F1 ปรากฏแถบสัญญาณต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 1 แสดงให้เห็นในเลนที่ 1 ($\Delta 60N_VP1$) และเลนที่ 3 (Fragment 1) โปรตีนมีขนาดประมาณ 45 และ 15 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (รูป 5.16)



รูปที่ 5.16 ผลการวิเคราะห์ด้วย 13% SDS-PAGE (A) Western blotting analysis โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 1 อัตราส่วน 1:5,000 (B) ของรีคอมบิแนนท์โคลนถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดย Lane 1, 3, 5, 7, 9 เป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกและ Lane 2, 4, 6, 8, 10 เป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออก

เลน M	Protein Marker (Bio-Rad)
เลน 1, 2	รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a- $\Delta 60N_VP1$ (control)
เลน 3, 4	รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a-F1 (Fragment 1)
เลน 5, 6	รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a-F2 (Fragment 2)
เลน 7, 8	รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a-F3 (Fragment 3)
เลน 9, 10	รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a-F4 (Fragment 4)

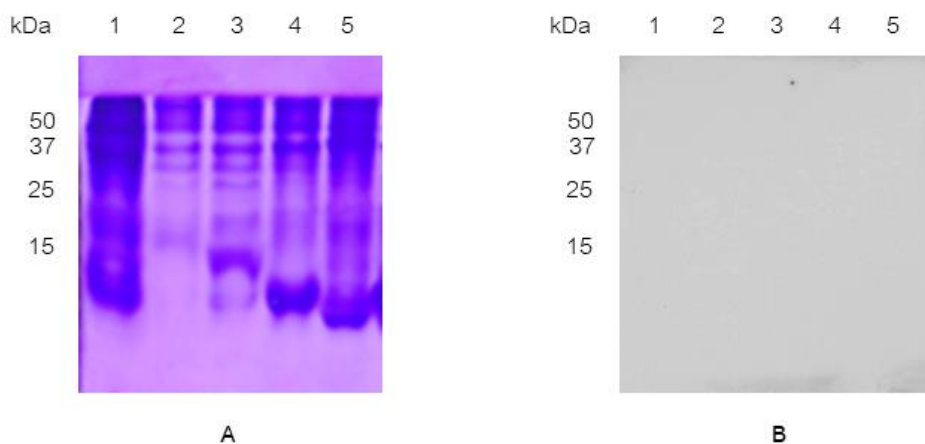
และยังพบรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (ควบคุม) และ F2 ปรากฏแถบสัญญาณต่อ โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 3 และ 21 แสดงให้เห็นในเลนที่ 1 ($\Delta 60N_VP1$) และเลนที่ 3 (Fragment 2) โปรตีนมีขนาดประมาณ 45 และ 13 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (รูป 5.17)



รูปที่ 5.17 ผลการวิเคราะห์ด้วย 18% Tricine gel SDS-PAGE (A) Western blotting analysis โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 3 (B) โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 21 (C) อัตราส่วน 1:5,000 ของรีคอมบิแนนท์โคลนที่ถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

- เลน 1 รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a- $\Delta 60N_VP1$ (control)
- เลน 2 รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a-F1 (Fragment 1)
- เลน 3 รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a-F2 (Fragment 2)
- เลน 4 รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a-F3 (Fragment 3)
- เลน 5 รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a-F4 (Fragment 4)

ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 29 ไม่ปรากฏแถบสัญญาณใดๆ ต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (ควบคุม), รีคอมบิแนนท์โปรตีน F1-F4 (รูป 5.18)

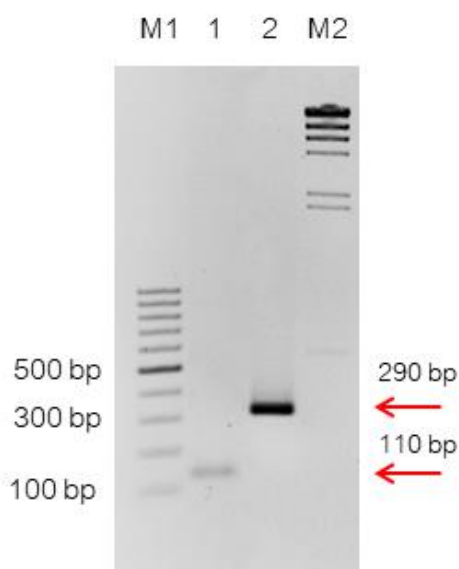


รูปที่ 5.18 ผลการวิเคราะห์ด้วย 18% Tricine gel SDS-PAGE (A) Western blotting analysis โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 29 อัตราส่วน 1:500 (B) ของรีคอมบิแนนท์โคลนที่ถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

- | | |
|-------|--|
| เลน 1 | รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a- $\Delta 60N_VP1$ (control) |
| เลน 2 | รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a-F1 (Fragment 1) |
| เลน 3 | รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a-F2 (Fragment 2) |
| เลน 4 | รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a-F3 (Fragment 3) |
| เลน 5 | รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a-F4 (Fragment 4) |

5.12 ผลการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พหุริเมอเรส ชิ้นส่วน Separating 1- Separating 2 (S1, S2)

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a-Fragment 1 ที่สกัดได้ มาเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์จำเพาะ ตั้งโปรแกรมดังตาราง 4.3 ตรวจสอบโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที จากผลการรันเจลโดยใช้ 1.5% อะกาโรสเจล พบชิ้นส่วนสารพันธุกรรม S1 และ S2 มีขนาดประมาณ 110 และ 290 คู่เบส ตามลำดับ (รูปที่ 5.19)



รูปที่ 5.19 ผลการวิเคราะห์ด้วย 1.5% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลา 60 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

เลน M1 100 bp Marker (Thermo scientific)

เลน 1 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ Separating 1 (S1)

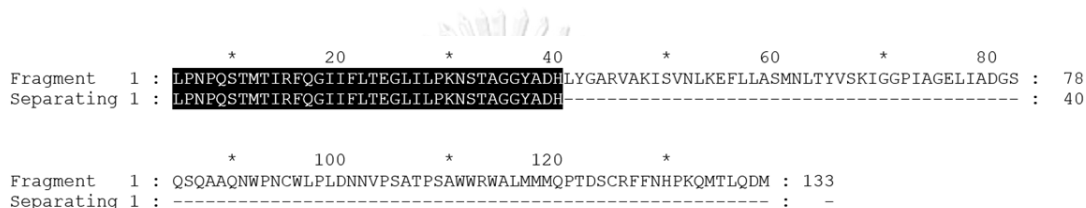
เลน 2 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ Separating 2 (S2)

เลน M2 λ HindIII Marker (Thermo scientific)

5.13 ผลการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pJET- S1 และ S2

นำชิ้นส่วนสารพันธุกรรม S1 และ S2 ที่เพิ่มปริมาณจากข้อ 4.4.2.2 เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pJET (Thermo Scientific) จากนั้นทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pJET-S1 และ S2 เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α (การทดลองที่ 4.1.1) และสกัดพลาสมิด (การทดลองที่ 4.4.1) ส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ผลการทดลอง แสดงลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Fragment 1 (ควบคุม) พบว่าชิ้นส่วน S1 และ S2 มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับตัวควบคุม 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงผลในรูปที่ 5.20-5.21

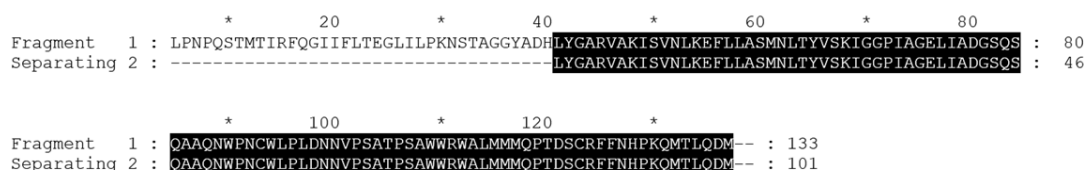


```

      *           20           *           40           *           60           *           80
Fragment 1 : LPNPQSTMTIRFQGIIFLTEGLILPKNSTAGGYADHLYGARVAKISVNLKEFLASMNLTYSKIGGPIAGELIADGSQ : 78
Separating 1 : LPNPQSTMTIRFQGIIFLTEGLILPKNSTAGGYADH----- : 40

      *           100          *           120          *
Fragment 1 : QQAQNWPNCWLPDNNVPSATPSAWWRWALMMMQPTDSCRFFNHPKQMTLQDM : 133
Separating 1 : ----- : -
  
```

รูปที่ 5.20 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Separating 1 ที่เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pJET1.2 blunt cloning kit เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Fragment 1 (ควบคุม)



```

      *           20           *           40           *           60           *           80
Fragment 1 : LPNPQSTMTIRFQGIIFLTEGLILPKNSTAGGYADHLYGARVAKISVNLKEFLASMNLTYSKIGGPIAGELIADGSQ : 80
Separating 2 : -----LYGARVAKISVNLKEFLASMNLTYSKIGGPIAGELIADGSQ : 46

      *           100          *           120          *
Fragment 1 : QQAQNWPNCWLPDNNVPSATPSAWWRWALMMMQPTDSCRFFNHPKQMTLQDM-- : 133
Separating 2 : QQAQNWPNCWLPDNNVPSATPSAWWRWALMMMQPTDSCRFFNHPKQMTLQDM-- : 101
  
```

รูปที่ 5.21 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Separating 2 ที่เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pJET1.2 blunt cloning kit เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Fragment 1 (ควบคุม)

5.14 ผลการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a- S1 และ S2

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pJET-S1 และรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pJET-S2 ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้อง ตัดเอาชิ้นส่วนสารพันธุกรรมออกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NdeI* และ *XhoI* ทำการเชื่อมชิ้นส่วนสารพันธุกรรมเข้ากับเวกเตอร์ pET28a (+) (Invitrogen) ด้วยเอนไซม์ T4 ligase จากนั้นทำการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้ง 2 ตัว เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α (การทดลองที่ 4.1.1) และสกัดพลาสมิด (การทดลองที่ 4.4.1) ส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโน เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของรีคอมบิแนนท์โปรตีน Fragment 1 แสดงผลในรูปที่ 5.22-5.23

```

*      20      *      40      *      60      *      80
Fragment 1 : MGS SHHHHHSSGLVPRGSHMLPNPQSTMTIRFQGIIFLTEGLILPKNSTAGGYADHLYGARVAKISVNLKEFLASMNL : 80
Separating 1 : MGS SHHHHHHSGLVPRGSHMLPNPQSTMTIRFQGIIFLTEGLILPKNSTAGGYADH----- : 58

*      100     *      120     *      140     *      160
Fragment 1 : TYVSKIGGPIAGELIADGSQSQAAQNWPNCWLPDNNVPSATPSAWWRWALMMMQPTDSCRFFNHPKQMTLQDMLE-- : 156
Separating 1 : ----- : -

```

รูปที่ 5.22 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Separating 1 ที่เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pET28a (+) เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Fragment 1 (ควบคุม)

```

*      20      *      40      *      60      *      80
Fragment 1 : MGS SHHHHHHSGLVPRGSHMLPNPQSTMTIRFQGIIFLTEGLILPKNSTAGGYADHLYGARVAKISVNLKEFLASMNL : 80
Separating 2 : MGS SHHHHHHSGLVPRGSHML-----LYGARVAKISVNLKEFLASMNL : 45

*      100     *      120     *      140     *      160
Fragment 1 : TYVSKIGGPIAGELIADGSQSQAAQNWPNCWLPDNNVPSATPSAWWRWALMMMQPTDSCRFFNHPKQMTLQDMLE-- : 156
Separating 2 : TYVSKIGGPIAGELIADGSQSQAAQNWPNCWLPDNNVPSATPSAWWRWALMMMQPTDSCRFFNHPKQMTLQDMLE-- : 116

```

CHULALONGKORN UNIVERSITY

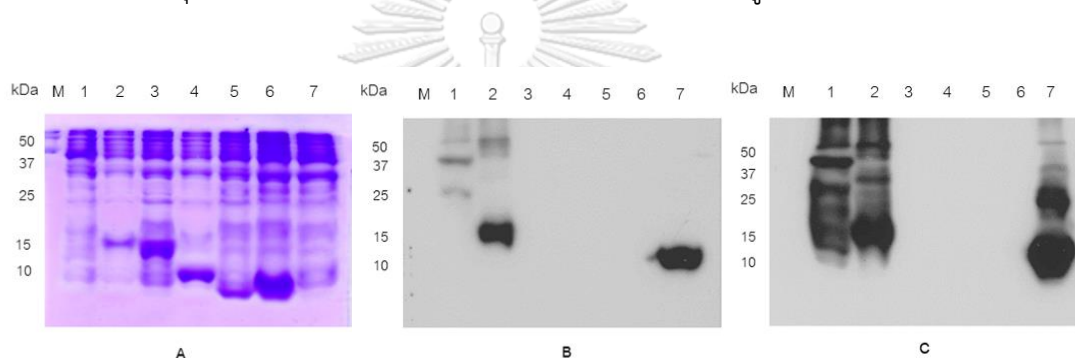
รูปที่ 5.23 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Separating 2 ที่เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pET28a (+) เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Fragment 1 (ควบคุม)

ผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a-S1 และรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a-S2 ที่สร้างขึ้น มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของรีคอมบิแนนท์โปรตีน Fragment 1 ดังนั้น รีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้ง 2 ตัว จึงเหมาะสมในการเลือกนำไปใช้ในการแสดงออกเพื่อหาเอพิโทปที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 1 ต่อไป

5.15 ผลการระบุเอพิโทปต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี

นำรีคอมบิแนนท์โคลน pET28a- Δ 60N_VP1, F1, F2, F3, F4, S1 และ S2 ชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย IPTG เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นติดตามผลด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting analysis โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 1 ทั้งก่อน และหลังทำให้บริสุทธิ์ เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิย้ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* Rosetta gami และชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย IPTG (การทดลองที่ 4.1) จากนั้นติดตามผลด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting analysis โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 1 ทั้งก่อน และหลังทำให้บริสุทธิ์ เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ อัตราส่วน 1: 5,000

จากผลการทดลอง พบรีคอมบิแนนท์โปรตีน Δ 60N_VP1 (ควบคุม), รีคอมบิแนนท์โปรตีน F1 และรีคอมบิแนนท์โปรตีน S2 ปรากฏแถบสัญญาณต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 1 ทั้งก่อน และหลังทำให้บริสุทธิ์ มีขนาดประมาณ 45, 15 และ 10 กิโลดาลตัน (รูป 24 เลข 1, 2 และ 7)



รูปที่ 5.24 ผลการวิเคราะห์ด้วย 18% Tricine gel SDS-PAGE (A) Western blotting analysis โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีก่อน (Pre) ทำให้บริสุทธิ์ (B) โมโนโคลนอลแอนติบอดีหลัง (Post) ทำให้บริสุทธิ์ (C) อัตราส่วน 1:5,000

CHULALONGKORN UNIVERSITY

เลน M	Protein Marker (Bio-Rad)
เลน 1	รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a- Δ 60N_VP1(control)
เลน 2	รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a-F1 (Fragment 1)
เลน 3	รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a-F2 (Fragment 2)
เลน 4	รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a-F3 (Fragment 3)
เลน 5	รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a-F4 (Fragment 4)
เลน 6	รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a-S1 (Separating 1)
เลน 7	รีคอมบิแนนท์โปรตีน pET28a-S2 (Separating 2)

บทที่ 6

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาการตอบสนองของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบว่าเมื่อนำรีคอมบิแนนท์โคลน $\Delta 60N_VP1$ (ศรุดา หวังอนุรักษ์กุล, 2558) มาชักนำให้เกิดการแสดงออกด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบการแสดงออกของโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (ศรุดา หวังอนุรักษ์กุล, 2558) ซึ่งปรากฏแถบสัญญาณที่จำเพาะขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Lee และคณะ (2009) อภิปรายผลว่าที่ปลาย N-Terminal ของโปรตีน VP1 ณ กรดอะมิโนลำดับที่ 50-60 มีกรดอะมิโน Arginine อยู่มาก ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli*. ทำให้ไม่สามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกโปรตีนได้ และเมื่อทำการตัดชิ้นส่วนบริเวณดังกล่าวออก พบว่าสามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน VP1 เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีน VP1 full length ที่ถูกชักนำให้เกิดการแสดงออก จึงนำรีคอมบิแนนท์โคลน $\Delta 60N_VP1$ (ที่ตัดลำดับกรดอะมิโน ลำดับที่ 1-60 ออก) มาขยายขนาดการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนด้วย IPTG เพื่อให้ได้โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ในปริมาณที่มากพอ ที่สามารถนำไปใช้เป็นแอนติเจนในการฉีดกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีในหนูเม้าส์ นำโปรตีนที่ได้จากการชักนำให้แสดงออกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ His-Trap column Ni^{2+} -NTA affinity chromatography โดยโปรตีนจะถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย Imidazole ความเข้มข้น 200 และ 300 มิลลิโมลาร์ และโปรตีนบริสุทธิ์จะอยู่ใน fraction ที่มี Imidazole ความเข้มข้น 200 และ 300 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ จากนั้นนำสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้ dialysis และทำให้สารละลายโปรตีนบริสุทธิ์เข้มข้นขึ้น วัดความเข้มข้นด้วยวิธี Bradford assay เปรียบเทียบกับค่าของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (BSA) พบว่าสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์มีความเข้มข้น 52,260 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นมากกว่า Lee และคณะ (2009) ที่ใช้เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* BL21 ในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน VP1 ด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และได้ทำโปรตีนให้มีความบริสุทธิ์โดยใช้ His-Trap column Ni^{2+} -NTA affinity chromatography โปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้มีความเข้มข้นเท่ากับ 26.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์เพื่อใช้ฉีดกระตุ้นการผลิตแอนติบอดี โดยใช้หนูเม้าส์เพศเมียอายุ 8 สัปดาห์ ทั้งหมด 4 ตัว เกิดข้อผิดพลาดจากการคำนวณความเข้มข้น ในการเตรียมสารละลายโปรตีนบริสุทธิ์ผิด งานวิจัยนี้จึงใช้โปรตีนบริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้นสูงมาก ในการใช้เป็นแอนติเจนเพื่อฉีดกระตุ้นการผลิตแอนติบอดีในแต่ละครั้ง ซึ่งใช้ความเข้มข้นประมาณ 0.52 มิลลิกรัมต่อการฉีดกระตุ้น 1 ครั้ง ต่อหนูเม้าส์ 1 ตัว ในการฉีดกระตุ้นครั้งแรก จะใช้แอนติเจนผสมกับ Freund's Complete Adjuvant (FCA) ครั้งที่ 2-4 จะผสมแอนติเจนกับ Freund's Incomplete Adjuvant (FIA) ในอัตราส่วน 1:1 ทำการฉีดกระตุ้นซ้ำทุกๆ 2 สัปดาห์ จนครบ 4 ครั้ง จากนั้นการฉีดยาตามหนูจำนวน 2 ตัว โดยให้ดม CO_2 แล้วผ่าเอา้ามมาหลอมรวมกับไมอีโกลมาเซลล์ด้วย 50% PEG ปริมาตร

1 มิลลิลิตร และทำการกระจายเซลล์ลง 96 well plate เลี้ยงเซลล์ในสภาวะ 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37° ซ และนำอาหารเลี้ยงเซลล์มาทดสอบหาการผลิตแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect ELISA โดยแอนติเจนที่ใช้ทดสอบมีความเข้มข้นเท่ากับ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ ให้ผลเป็นบวกทั้งสิ้น 60 โคลน และทำการเจือจางเซลล์ ด้วยวิธี Limiting dilution เพื่อกระจายเซลล์ ให้ได้เซลล์เดี่ยว จนได้เป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดี พบโคลนที่ผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ทั้งสิ้น 6 โคลน ได้แก่ โคลนที่ 1 (6-5B-5B-12F-10A) โคลนที่ 2 (2D-A8-C4) โคลนที่ 3 (3-A1-F4, 3-C7-A8, 3-F1-H3) โคลนที่ 7 (7-E2-G7-E10) โคลนที่ 21 (21-A11-B8, 21-H1-B3) และโคลนที่ 29 (29G-E1-D5-A9, 29G-E1-D5-D5, 29G-E1-D5-G3) Pan และคณะ (2015) ได้ใช้รีคอมบิแนนท์ โปรตีน N protein ของไวรัสท้องร่วงรุนแรงในสุกร (Porcine Epidemic Diarrhea Virus; PEDV) เป็นแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นการผลิตแอนติบอดี ซึ่งใช้ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม ต่อการฉีดกระตุ้น 1 ครั้ง/หนูเม้าส์ 1 ตัว โดยแอนติเจนที่ Pan และคณะ (2015) ใช้มากกว่า 100 เท่า ในงานวิจัย ดังกล่าว สามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ได้จำนวน 1 โคลน (2B8)

นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 6 โคลน มาจัดจำแนกคลาสของแอนติบอดี (Isotype) พบว่าแต่ละ โคลนเป็นแอนติบอดีคลาส IgG_{2a}, IgM, IgG_{2b}, IgM, IgG₁, IgG_{2b}/IgM ตามลำดับ การที่โคลนที่ 29 ปรากฏผลของไอโซไทป์ 2 คลาส (IgG_{2b} หรือ IgM) จึงสันนิษฐานว่าแอนติบอดีโคลนที่ 29 อาจจะเป็น โพลีโคลนอลแอนติบอดีอยู่ จึงเลือกแอนติบอดีคลาส IgG ได้แก่โคลนที่ 1, 3 และ 21 ทดสอบความไว (sensitivity) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 1 ให้ค่าความไวสูงที่สุด สามารถเจือจางแอนติบอดี ได้ถึง 1:32,768 ในขณะที่แอนติบอดีโคลนที่ 3 และ 21 เจือจางได้ถึง 1: 2,048 จากนั้นทำการขยาย ขนาดการเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 1 เพื่อให้ได้แอนติบอดีในปริมาณที่มาก พอที่จะนำไปทำให้บริสุทธิ์ โดยเลี้ยงเซลล์ที่ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 1 ในอาหารเลี้ยง เซลล์ ISF ปริมาตร 350 มิลลิลิตร ปั่นแยกเซลล์ออก และใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ทำให้บริสุทธิ์ด้วย Hi-Trap protein G HP column แอนติบอดีถูกชะออกจากคอลัมน์อยู่ใน fraction ที่ 8-13 ทำการรวม fraction แล้วนำไปหาความเข้มข้นของโมโนโคลนอลแอนติบอดีบริสุทธิ์ด้วยวิธี BCA นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับค่าสารละลายโปรตีนมาตรฐาน พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความ เข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีแอนติบอดีปริมาตรรวม 6 มิลลิลิตร

นอกจากนี้ ทางผู้วิจัยได้ทำการหาเอพิโทปที่จำเพาะต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ โดยนำ รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a- $\Delta 60N_VP1$ ที่สกัดได้โดย ศรุดา หวังอนุรักษกุล (2558) มาเป็น ต้นแบบในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยแบ่งเป็น 4 ชิ้นส่วน ได้แก่ Fragment 1 (F1), F2, F3 และ F4 มีขนาดประมาณ 400, 350, 250 และ 150 คู่เบส ตามลำดับ และใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a-Fragment 1 เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยแบ่งเป็น 2 ชิ้นส่วน ได้แก่ Separating 1 (S1) และ Separating 2 (S2) มีขนาดประมาณ 110 และ 290 คู่เบส ตามลำดับ จากนั้นโคลนเข้าเวกเตอร์ pET28a (+) และทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* DH5 α สุ่มรีคอมบิแนนท์โคลน แบบคทีเรีย ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ นำผลนิวคลีโอไทด์แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน ทำการ เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของชิ้นส่วน F1-F4 กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน $\Delta 60N_VP1$

(ควบคุม) และเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของชิ้นส่วน S1 และ S2 กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Fragment 1 (ควบคุม) จากนั้น เลือกรีคอมบิแนนท์โคลนที่มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของตัวควบคุม 100% ย้ายเข้าสู่ *E. coli* Rosetta-gami แล้วชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วยวิธี western blotting analysis โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 1, 3 และ 21 และใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 29 เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ พบว่าโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (ควบคุม), F1 และ S2 แสดงแถบสัญญาณต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 1 แถบสัญญาณที่ปรากฏมีขนาดประมาณ 45, 15 และ 10 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ในขณะที่โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (ควบคุม) และ F2 แสดงแถบสัญญาณต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 3 และ 21 มีขนาดประมาณ 45 และ 13 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 3 โคลน ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีนอื่นๆ ที่มี His-tag ใดๆก็ตาม ผลการทำ western blotting analysis โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 29 เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ ไม่พบสัญญาณใดๆ ต่อโปรตีนทั้ง 6 ชิ้น รวมไปถึงโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (ควบคุม) ในขณะทดสอบด้วยวิธี Indirect-ELISA กลับพบการตอบสนองระหว่างแอนติเจน $\Delta 60N_VP1$ ต่อแอนติบอดีโคลนที่ 29 ซึ่งแอนติเจนที่ใช้ทดสอบไม่ได้ถูกทำให้เสื่อมสภาพ จึงสันนิษฐานว่าในการทำ western blotting analysis โปรตีนที่ใช้ทดสอบจะถูกทำให้เสื่อมสภาพ ด้วยความร้อนเป็นเวลา 10 นาที, SDS และ β -mercaptional ทำให้รูปแบบการม้วนพับของโปรตีนเปลี่ยนไปจากปกติ จึงไม่สามารถใช้แอนติบอดีโคลน 29 ในการทำ western blotting analysis ได้ ซึ่งสามารถทดสอบสมมติฐานโดยการทำ SDS-PAGE ในรูปของ native form หรือทำ Indirect-ELISA โดยทำให้แอนติเจนเสื่อมสภาพก่อนที่จะตรึงใน 96-well plate เป็นต้น

จากงานวิจัยทั้งหมดนี้สรุปได้ว่า ผู้วิจัยสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ได้ทั้งหมด 3 โคลน ได้แก่ โคลนที่ 1, 3 และ 21 นอกจากนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 1 จับเอพิโทป บนโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ณ กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 97-193 และโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนที่ 3 และ 21 จับเอพิโทปบนโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ณ กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 194-310 ในอนาคตสามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 3 โคลนไปใช้งานวิจัยอื่นๆ ได้เช่น การนำไปพัฒนาในการทำชุดตรวจสอบ (Strip test) หาไวรัสโกลีตาจิสต์ได้

รายการอ้างอิง

1. สถาบันอาหารกระทรวงอุตสาหกรรม. การส่งออกอาหารไทย ไตรมาสที่ 2/2558 และแนวโน้มปี 2558. 2558; Available from: http://fic.nfi.or.th/broadcast/Thai_Food_Industry_Q2.2015_and_Trend_2015..pdf
2. ชารานาย, ป. เอกสารประกอบการสอนโรคสัตว์ปีกและการป้องกัน. 2559; Available from: http://www.as.mju.ac.th/E-Book/t_prapakorn/pdf.
3. Adair, B.M., *Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection*. Dev Comp Immunol, 2000. **24**(2-3): p. 247-55.
4. Yotis, W.W., et al., *Biochemical properties of the outer membrane of Treponema denticola*. J Clin Microbiol, 1991. **29**(7): p. 1397-406.
5. Yuasa, N., *Propagation and infectivity titration of the Gifu-1 strain of chicken anemia agent in a cell line (MDCC-MSB1) derived from Marek's disease lymphoma*. Natl Inst Anim Health Q (Tokyo), 1983. **23**(1): p. 13-20.
6. Markowski-Grimrud, C.J. and K.A. Schat, *Infection with chicken anaemia virus impairs the generation of pathogen-specific cytotoxic T lymphocytes*. Immunology, 2003. **109**(2): p. 283-94.
7. Shen, S.Y., et al., *Development of a subunit vaccine containing recombinant chicken anemia virus VP1 and pigeon IFN-gamma*. Vet Immunol Immunopathol, 2015. **167**(3-4): p. 200-4.
8. หวังอนุรักษ์กุล, ศ., การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP1 และ VP2 จากไวรัสโลหิตจางในไก่, จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์. 2558, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
9. Goryo, M., et al., *Isolation of an agent inducing chicken anaemia*. Avian Pathol, 1985. **14**(4): p. 483-96.
10. McNulty, M.S., *Chicken anaemia agent: a review*. Avian Pathol, 1991. **20**(2): p. 187-203.
11. Yuasa, N., et al., *Distribution of chicken anemia agent (CAA) and detection of neutralizing antibody in chicks experimentally inoculated with CAA*. Natl Inst Anim Health Q (Tokyo), 1983. **23**(3): p. 78-81.
12. *Hematopoietic stem cell*. 2018; Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Hematopoietic_stem_cell.
13. Gholami-Ahangaran, M., *Serological and molecular detection of chicken anaemia virus in Iranian poultry flocks*. Vet Ital, 2015. **51**(3): p. 211-5.

14. Davidson, I. and L.M. Shulman, *Unraveling the puzzle of human anellovirus infections by comparison with avian infections with the chicken anemia virus*. *Virus Res*, 2008. **137**(1): p. 1-15.
15. *Gyrovirus*. 2018; Available from: https://viralzone.expasy.org/117?outline=all_by_species.
16. Kamada, K., et al., *Spliced mRNAs detected during the life cycle of Chicken anemia virus*. *J Gen Virol*, 2006. **87**(Pt 8): p. 2227-33.
17. Aebischer, N., et al., *Transesophageal echocardiography (TEE): its use in today's cardiology*. *R I Med J*, 1991. **74**(11): p. 511-6.
18. Koch, G., et al., *Immunogenic and protective properties of chicken anaemia virus proteins expressed by baculovirus*. *Vaccine*, 1995. **13**(8): p. 763-70.
19. Noteborn, M.H., et al., *Simultaneous expression of recombinant baculovirus-encoded chicken anaemia virus (CAV) proteins VP1 and VP2 is required for formation of the CAV-specific neutralizing epitope*. *J Gen Virol*, 1998. **79** (Pt **12**): p. 3073-7.
20. Peters, M.A., et al., *Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(42): p. 39566-73.
21. Noteborn, M.H., *Chicken anemia virus induced apoptosis: underlying molecular mechanisms*. *Vet Microbiol*, 2004. **98**(2): p. 89-94.
22. Noteborn, M.H. and G. Koch, *Chicken anaemia virus infection: molecular basis of pathogenicity*. *Avian Pathol*, 1995. **24**(1): p. 11-31.
23. Okamoto, H. and M. Mayumi, *TT virus: virological and genomic characteristics and disease associations*. *J Gastroenterol*, 2001. **36**(8): p. 519-29.
24. Claessens, J.A., et al., *Molecular cloning and sequence analysis of the genome of chicken anaemia agent*. *J Gen Virol*, 1991. **72** (Pt **8**): p. 2003-6.
25. Ilyina, T.V. and E.V. Koonin, *Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaeobacteria*. *Nucleic Acids Res*, 1992. **20**(13): p. 3279-85.
26. Renshaw, R.W., et al., *A hypervariable region in VP1 of chicken infectious anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture*. *J Virol*, 1996. **70**(12): p. 8872-8.
27. Hoop, R.K., *Transmission of chicken anaemia virus with semen*. *Vet Rec*, 1993. **133**(22): p. 551-2.
28. Urlings, H.A., et al., *Inactivation of chicken anaemia virus in chickens by heating and fermentation*. *Vet Q*, 1993. **15**(3): p. 85-8.

29. Yuasa, N., *Effect of chemicals on the infectivity of chicken anaemia virus*. Avian Pathol, 1992. **21**(2): p. 315-9.
30. ชัยสิงห์, อ. โรคโลหิตจางติดต่อในไก่. 2018; Available from: <http://tvma.tripod.com/news/CIA.html>.
31. McConnell, C.D., B.M. Adair, and M.S. McNulty, *Effects of chicken anemia virus on macrophage function in chickens*. Avian Dis, 1993. **37**(2): p. 358-65.
32. McConnell, C.D., B.M. Adair, and M.S. McNulty, *Effects of chicken anemia virus on cell-mediated immune function in chickens exposed to the virus by a natural route*. Avian Dis, 1993. **37**(2): p. 366-74.
33. McNulty, M.S., et al., *A serological survey of domestic poultry in the United Kingdom for antibody to chicken anaemia agent*. Avian Pathol, 1988. **17**(2): p. 315-24.
34. Todd, D., J.L. Creelan, and M.S. McNulty, *Dot blot hybridization assay for chicken anemia agent using a cloned DNA probe*. J Clin Microbiol, 1991. **29**(5): p. 933-9.
35. Tham, K.M. and W.L. Stanislawek, *Polymerase chain reaction amplification for direct detection of chicken anemia virus DNA in tissues and sera*. Avian Dis, 1992. **36**(4): p. 1000-6.
36. Allan, G.M., et al., *In situ hybridization for the detection of chicken anemia virus in formalin-fixed, paraffin-embedded sections*. Avian Dis, 1993. **37**(1): p. 177-82.
37. Brentano, L., et al., *Isolation and identification of chicken infectious anemia virus in Brazil*. Avian Dis, 1991. **35**(4): p. 793-800.
38. Simionatto, S., et al., *Characterization and phylogenetic analysis of Brazilian chicken anaemia virus*. Virus Genes, 2006. **33**(1): p. 5-10.
39. Caterina, K.M., et al., *Development of a multiplex PCR for detection of avian adenovirus, avian reovirus, infectious bursal disease virus, and chicken anemia virus*. Mol Cell Probes, 2004. **18**(5): p. 293-8.
40. Lacorte, C., et al., *Assessing the expression of chicken anemia virus proteins in plants*. Virus Res, 2007. **129**(2): p. 80-6.
41. Lee, M.S., et al., *High yield expression in a recombinant E. coli of a codon optimized chicken anemia virus capsid protein VP1 useful for vaccine development*. Microb Cell Fact, 2011. **10**: p. 56.
42. Pallister, J., K.J. Fahey, and M. Sheppard, *Cloning and sequencing of the chicken anaemia virus (CAV) ORF-3 gene, and the development of an ELISA for the detection of serum antibody to CAV*. Vet Microbiol, 1994. **39**(1-2): p. 167-78.

43. สิทธิกรกุล, ไ., วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย. 2548, กรุงเทพมหานคร: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.
44. สารสมบัติ, ส., อิมมูโนวิทยา. 2541, กรุงเทพมหานคร: บริษัทพรินต์โพร.
45. *Encyclopaedia Britannica*. 2018; Available from: <https://www.britannica.com/science/antibody>.
46. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. *Nature*, 1975. **256**(5517): p. 495-7.
47. Stern, M. and R. Herrmann, *Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2005. **54**(1): p. 11-29.
48. Trikha, M., L. Yan, and M.T. Nakada, *Monoclonal antibodies as therapeutics in oncology*. *Curr Opin Biotechnol*, 2002. **13**(6): p. 609-14.
49. Duan, J. and Z. Yuan, *Development of an indirect competitive ELISA for ciprofloxacin residues in food animal edible tissues*. *J Agric Food Chem*, 2001. **49**(3): p. 1087-9.
50. Loomans, E.E., et al., *Neamin as an immunogen for the development of a generic ELISA detecting gentamicin, kanamycin, and neomycin in milk*. *J Agric Food Chem*, 2003. **51**(3): p. 587-93.
51. Watanabe, H., et al., *Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for enrofloxacin in biological matrices*. *Analyst*, 2002. **127**(1): p. 98-103.
52. ปาลกะ, ธ., เทคโนโลยีทางภูมิคุ้มกันวิทยา. 2553, กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
53. คงคาวิฑูร, พ., การผลิตและลักษณะสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแแรกโทพามีน, in เทคโนโลยีชีวภาพ. 2551, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
54. Nelson, P.N., et al., *Monoclonal antibodies*. *Mol Pathol*, 2000. **53**(3): p. 111-7.
55. ชารากุล, ธ. ชุดตรวจวินิจฉัยโดยหลักการวิทยานิพนธ์ฉบับนี้. 2545.
56. แผนภาพของ *pJET1.2/blunt cloning vector*. 2018; Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1231>.
57. แผนภาพของ *pET-28a (+) vector*. 2018; Available from: <http://www.keywordsking.com/cGVOMjhhIHZLY3RvciBtYXA/>.

ภาคผนวก

หมวดที่ 1 โปรีตีน และการแสดงออกของโปรีตีน

1. 3X Gel buffer

- Trisma base 36.3 g
- HCl 4.5 ml
- SDS 0.3 g

** ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.45 และปรับปริมาตรด้วย DDW ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 ml จากนั้นกรองด้วย filter

2. 4X SDS-Sample Loading buffer

- 200 mM Tris-HCl pH 6.8 6 ml
- 400 mM DTT 1.851 g
- SDS 2.4 g
- Bromophenol blue 0.02 g
- 40% Glycerol 12 ml
- Ultrapure water 12 ml

** นำไป Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง

3. 5% Skim milk-PBST

- PBST 25 ml
- Skim milk 1.25 g

4. 10% ammonium persulfate (APS)

- APS 5 g
- Ultrapure water 50 ml

5. 10X Anode Running buffer (Buffer for Tricine gel)

- Trisma base 121 g
- HCl 10 ml

** ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.9 และปรับปริมาตรด้วย DDW ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 L

ภาคผนวก (ต่อ)

6. 10X Catode Running buffer (Buffer for Tricine gel)

● Trisma base	121	g
● Tricine	179	g
● SDS	10	g

** ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.25 และปรับปริมาตรด้วย DDW ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 L

7. 10X SDS Running buffer (Buffer for Glycine gel)

● Glycine	144	g
● SDS	10	g
● Trisma base	30	g
● DIW	1	L

** ก่อนใช้ ปรับความเข้มข้นเป็น 1X โดยผสม 10X SDS running buffer 100 ml ต่อ DIW 900 ml

8. 10x SDS Transfer buffer

● Glycine	29	g
● SDS	3.7	g
● Trisma base	50.8	g
● DIW	800	ml

** ปรับความเข้มข้นเป็น 1X โดยผสม 10X transfer buffer 100 ml ต่อ DIW 900 ml

** ก่อนใช้ ผสม 1X transfer buffer 400 ml ต่อ methanol 100 ml เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ช

9. 30% Acrylamide

● Acrylamide	87	g
● Bisacrylamide	3	g
● Ultrapure water	40	ml

** หลังจากละลายแล้วเติม Ultrapure water ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 300 ml

10. 55% Acrylamide

● Acrylamide	46.5	g
● Bisacrylamide	3	g
● Ultrapure water	40	ml

** หลังจากละลายแล้วเติม Ultrapure water ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 ml

ภาคผนวก (ต่อ)

11. Chemiluminescent substrates (for HRP)

● 100 mM Tris-HCl pH 8.5	5	ml
● 90 mM p-Coumaric acid in DMSO	11	μl
● 250 mM Luminol in DMSO	25	μl
● 30% H ₂ O ₂	1.5	μl

12. Coomassie brilliant blue Staining solution

● Coomassie brilliant blue R-250	2.5	g
● Methanol	500	ml
● DIW	400	ml
● Acetic acid (Gracial)	100	ml

** ละลาย Coomassie brilliant blue R-250 ใน Methanol ก่อนเติมน้ำ และ Acetic acid

13. Coomassie brilliant blue De-staining solution

● Methanol	500	ml
● Acetic acid (Gracial)	100	ml
● DIW	400	ml

14. PBST (0.5% Tween 20)

● 10X PBS	100	ml
● Tween 20	500	μl
● DIW	900	ml

15. Fix Solution

● Methanol	100	ml
● Acetic acid (Gracial)	100	ml
● Glycerol	50	ml
● DIW	750	ml

ภาคผนวก (ต่อ)

หมวดที่ 2 ทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

1. 1% EDTA

- EDTA 2 g
- DIW 200 ml

2. 1M PCE elution buffer

- PCW 250 ml
- Imidazole 17 g

** ก่อนใช้ ปรับความเข้มข้นสุดท้ายตามที่ต้องการ ในงานวิจัยนี้ใช้ความเข้มข้นที่ 40mM, 60mM, 100mM, 200mM และ 300mM Imidazole จากนั้นนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. PCL (lysis) buffer

- 1X PBS 500 ml
- 1% SDS 5 g

** Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม DTT ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1mM

4. 10X PBS (Dialysis buffer)

- NaCl 80 g
- KCl 2 g
- Na₂HPO₄ 14.4 g
- KH₂PO₄ 2.4 g

** ละลายใน DIW 800 ml ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.4 และเติม DIW ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 L นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนใช้ ปรับความเข้มข้นเป็น 1X โดยผสมกับ DIW

5. PCW washing buffer

- 1X PBS 1 L
- 0.1% Sarkosyl 1 g

** Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก (ต่อ)

6. Strip buffer

- 1X PBS 100 ml
- 50 mM EDTA 1.86 g

หมวดที่ 3 ผลิตภัณฑ์โคลนอลแอนติบอดี

1. 0.1 M Glycine-HCL buffer (Buffer A)

- Glycine 7.5 g
- DIW 1 L

** ปรับ pH ด้วย [conc. HCL] ให้เท่ากับ 2.7 จากนั้นกรองด้วย filter 0.2 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. 20 mM Sodium phosphate (Buffer B)

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 7.16 g
- DIW 500 ml

** ละลายแล้ว ปรับ pH ด้วย NaH_2PO_4 ให้เท่ากับ 7 จากนั้นเติม DIW ให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 L แล้วกรองด้วย filter 0.2 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. 205 mM Potassium Citrate buffer (TMB buffer)

- Potassium citrate 33.2 g
- Citric acid 21.54 g

** ปรับ pH ด้วย Citric acid ให้เท่ากับ pH 4 จากนั้นเติม DDW ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 L

4. Stop solution (1N H_2SO_4)

- H_2SO_4 27.5 ml
- DDW 1 L

ภาคผนวก (ต่อ)

5. RPMI-1640 media

● NaHCO ₃	2	g
● L-glutamine	0.1	g
● Glucose	2	g
● Pyruvic acid	0.11	g
● RPMI-1640	10.4	g
● DDW	1	L

** เตรียม Hypoxanthine, Aminopterin และ Thymidine เป็น 100X (10mg/ml) สำหรับ HAT medium

** เตรียม Hypoxanthine และ Thymidine เป็น 100X (10mg/ml) สำหรับ HT medium

6. TMB substrate (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine; TMB)/1 plate

● TMB substrate	3	mg
● DMSO	300	μl
● 205 mM Potassium Citrate buffer	10	ml
● 30% H ₂ O ₂	3.4	μl

หมวดที่ 4 โคลนนิ่ง

1. 34mg/ml Chloramphenical

● Chloramphenical	1.02	g
● 100% Ethanol (AR grade)	30	ml

** ทำยาปฏิชีวนะให้ปลอดเชื้อ โดยการกรองเท่านั้น

2. 50mg/ml Kanamycin

● Kanamycin	1	g
● Ultrapure water	20	ml

** ทำยาปฏิชีวนะให้ปลอดเชื้อ โดยการกรองเท่านั้น

3. 50X TAE buffer

● Tris base	242	g
● Acetic acid	57.1	ml
● 0.5M EDTA pH 8	100	ml

** ปรับปริมาตรด้วย DDW ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 L

ภาคผนวก (ต่อ)

4. 100mg/ml Ampicillin

- | | | |
|-------------------|----|----|
| ● Ampicillin | 1 | g |
| ● Ultrapure water | 10 | ml |

** ทำยาปฏิชีวนะให้ปลอดเชื้อ โดยการกรองเท่านั้น

5. Luria Bertani (LB) medium

- | | | |
|----------------------|----|---|
| ● 0.5% Yeast extract | 5 | g |
| ● 1% NaCl | 10 | g |
| ● 1% Tryptone | 10 | g |
| ● 1.5% Agar | 15 | g |

** นำไป Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (อาหารเหลวไม่เติม Agar)



ภาคผนวก (ต่อ)

ตารางแสดงผลการหาค่าความเข้มข้นของแอนติเจน (Titer) ที่เหมาะสมต่อการตรวจหาแอนติบอดีต่อ CAV

ระดับ เจือจางซีรัม	หนู เม้าส์ BALB/c	ปริมาณแอนติเจน (นาโนกรัมต่อหลุม)					
		100 ng		500 ng		1,000 ng	
		Pre*	Post*	Pre*	Post*	Pre*	Post*
1:500	เบอร์ 1	0.2339	0.4955	0.2657	0.5485	0.2572	0.8159
	เบอร์ 2	0.2777	0.6200	0.3110	1.0466	0.4349	1.8092
	เบอร์ 3	0.2171	0.6213	0.2457	0.8918	0.2629	0.8257
	เบอร์ 4	0.2372	0.4399	0.1515	0.4365	0.1862	0.5893
1:1,000	เบอร์ 1	0.2114	0.3741	0.1808	0.3034	0.2154	0.4371
	เบอร์ 2	0.3091	0.3759	0.1953	0.7696	0.2125	1.2566
	เบอร์ 3	0.2003	0.4139	0.1793	0.5538	0.1894	0.6891
	เบอร์ 4	0.1587	0.2739	0.1330	0.2814	0.1584	0.3766
1:2,000	เบอร์ 1	0.1826	0.2485	0.1490	0.2206	0.2044	0.3092
	เบอร์ 2	0.2036	0.2386	0.1643	0.4697	0.2138	0.7359
	เบอร์ 3	0.1517	0.2917	0.1362	0.3945	0.1667	0.5416
	เบอร์ 4	0.1315	0.2072	0.1239	0.1955	0.1385	0.2628
1:4,000	เบอร์ 1	0.1499	0.1940	0.1469	0.2001	0.1631	0.2500
	เบอร์ 2	0.1575	0.1760	0.1340	0.3114	0.1877	0.4352
	เบอร์ 3	0.1282	0.1992	0.1244	0.2470	0.1705	0.3650
	เบอร์ 4	0.1188	0.1625	0.1046	0.1512	0.1317	0.2132
1:8,000	เบอร์ 1	0.1257	0.1809	0.1293	0.1353	0.1530	0.2121
	เบอร์ 2	0.1274	0.1344	0.1275	0.1936	0.1821	0.2999
	เบอร์ 3	0.1242	0.1486	0.0995	0.1854	0.1482	0.2777
	เบอร์ 4	0.1094	0.1368	0.1072	0.1449	0.1531	0.8312
1:16,000	เบอร์ 1	0.1224	0.1677	0.1128	0.1643	0.1795	0.1866
	เบอร์ 2	0.1159	0.1045	0.1256	0.1438	0.1669	0.2028
	เบอร์ 3	0.1118	0.1250	0.1168	0.1571	0.1458	0.1970
	เบอร์ 4	0.0961	0.1135	0.1065	0.1315	0.1365	0.1653
Control	-	0.0765 (-)	1.1232 (+)	0.0731 (-)	2.7912 (+)	0.1036 (-)	3.251 (+)

*Pre คือ serum ที่เก็บจากหนูเม้าส์จำนวน 4 ตัว ก่อนทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรก

*Post คือ serum ที่เก็บจากหนูเม้าส์จำนวน 4 ตัว หลังทำการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งที่สอง

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล นายเอกราช สิทธิเดช

วัน/เดือน/ปีเกิด 23 มกราคม 2535

สถานที่เกิด โรงพยาบาลจังหวัดระนอง

ประวัติการศึกษา

- พ.ศ. 2550- พ.ศ. 2552
ระดับมัธยมศึกษาสาขาวิทยาศาสตร์-คณิตศาสตร์
โรงเรียนฤทธิยะวรรณาลัย 1
- พ.ศ. 2553- พ.ศ. 2556
ปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.)
ภาควิชาชีววิทยา สาขาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (วิทยาเขตประสานมิตร)
- พ.ศ. 2557- พ.ศ. 2560
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปริญญาโทวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.บ.)
CHULALONGKORN UNIVERSITY
ภาควิชาจุลชีววิทยา สาขาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลงานทางวิชาการ

นำเสนอผลงานวิจัยเรื่อง MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF FOUR REGIONS OF VP1 PROTEIN FROM CHICKEN ANEMIA VIRUS ในงาน The International Conference on Agriculture and Natural Resources 2018 (ANRES 2018) ระหว่างวันที่ 26-28 เมษายน พ.ศ.2561 จัดโดย Kasetsart University Research and Development Institute, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย.