

การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP1 และ VP2 จากไวรัสก่อโรคโลหิตจางในไก่
ใน *Escherichia coli* และการผลิตแอนติบอดี

นางสาวศรุดา หวังอนุรักษ์กุล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

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

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EXPRESSION OF RECOMBINANT PROTEINS VP1 AND VP2 FROM CHICKEN ANEMIA VIRUS
IN *Escherichia coli* AND ANTIBODY PRODUCTION

Miss Saruda Wanganurakkul



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

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

ศรุตฯ หวังอนุรักษ์กุล : การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP1 และ VP2 จากไวรัสก่อโรคโลหิตจางในไก่ใน *Escherichia coli* และการผลิตแอนติบอดี (EXPRESSION OF RECOMBINANT PROTEINS VP1 AND VP2 FROM CHICKEN ANEMIA VIRUS IN *Escherichia coli* AND ANTIBODY PRODUCTION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. วันชัย อัครลาภสกุล, 174 หน้า.

โรคโลหิตจางในไก่เป็นโรคที่ทำให้ไก่เกิดภาวะโลหิตจางชนิดรุนแรงและส่งผลให้การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันลดต่ำลงซึ่งสาเหตุสำคัญเกิดจากการติดเชื้อไวรัสก่อโรคโลหิตจางในไก่ (Chicken Anemia Virus, CAV) โปรตีน VP1 ซึ่งเป็นโปรตีนหลักของเชื้อไวรัส CAV ด้วยคุณสมบัติในการเป็นแอนติเจนที่สูงสามารถถูกจดจำได้ดีจึงถูกนำไปใช้พัฒนาเป็นวัคซีนและชุดตรวจวินิจฉัยโรค จากการที่โปรตีน VP1 มีส่วนเป็นพิษต่อ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นเซลล์เจ้าบ้าน จำนวน 60 กรดอะมิโน ที่ปลาย N-terminal จึงเป็นข้อจำกัดทำให้ผลิตโปรตีน VP1 ได้ในปริมาณน้อย นอกจากนี้ยังมีโปรตีน VP2 ซึ่งเป็นโปรตีนไม่ใช่โปรตีนโครงสร้างมีบทบาทสำคัญในการช่วยในการม้วนพับของโปรตีน VP1 ทำให้เกิดโครงสร้างอีพิโทปของไวรัสที่เหมาะสม จุดประสงค์ในงานวิจัยนี้เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP1 และ VP2 และการผลิตแอนติบอดีในหนูเมซ ด้วยการผลิตเป็นพิษต่อเซลล์เจ้าบ้านออก จำนวน 60 กรดอะมิโน ที่ปลาย N-terminal ($\Delta 60N_VP1$) แล้วเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอ VP2 จึงได้รูปแบบของดีเอ็นเอต่างๆ ดังนี้ $\Delta 60N_VP1$, VP2, $VP2/\Delta 60N_VP1$ และ $\Delta 60N_VP1/VP2$ ดีเอ็นเอทั้ง 4 รูปแบบได้ถูกโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pET28a(+) และชักนำเกิดการแสดงออกใน *E.coli* สายพันธุ์ Roseta-gami โดยใช้ IPTG ความเข้มข้น 0.2-0.3 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง รีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้งหมดได้ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography ซึ่งขนาดโปรตีนของ $\Delta 60N_VP$, VP2, $VP2/\Delta 60N_VP1$ และ $\Delta 60N_VP1/VP2$ ดังนี้คือ 45, 28, 73 และ 85 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ด้วยคุณสมบัติในการเป็นแอนติเจนที่ดีของโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ จึงได้นำมาใช้สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CAV จากซีรัมไก่ จำนวน 152 ตัวอย่าง ด้วยวิธี indirect ELISA โดยพบให้ความไว ความจำเพาะ และความแม่นยำ เท่ากับ 87.50%, 95.31% และ 90.79% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าภายหลังการนำโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ไปฉีดกระตุ้นในหนูเมซ พบว่าหนูเมซมีการตอบสนองและผลิตพอลิโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ได้ ดังนั้นโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ จึงเป็นแอนติเจนที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้พัฒนาวัคซีนและแอนติบอดีต่อโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ตรวจหาเชื้อไวรัส CAV ได้ต่อไป

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2557

5472109423 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS: CHICKEN ANEMIA VIRUS / VP1 / VP2 / INDIRECT ELISA / POLYCLONAL ANTIBODIES

SARUDA WANGANURAKKUL: EXPRESSION OF RECOMBINANT PROTEINS VP1 AND VP2 FROM CHICKEN ANEMIA VIRUS IN *Escherichia coli* AND ANTIBODY PRODUCTION.
ADVISOR: ASST. PROF. WANCHAI ASSAVALAPSAKUL, Ph.D., 174 pp.

Chicken Infectious Anemia (CIA) is a disease causing the severe anemia and immunosuppression in chicken. The disease is caused by Chicken Anemia Virus (CAV). VP1 protein found in the capsid of CAV has been well-recognized as its high antigenicity and thus serves as a strong candidate for the development of vaccine and a diagnostic marker. The problematic of VP1 in *Escherichia coli* found the 60 amino acid sequence at the N-terminus of VP1 related to be toxic to host then lead to the less yield protein production. Other non-structural protein as VP2, the protein that help enhance the folding of VP1 epitope. For the purpose of VP1 and VP2 recombinant protein production and production antibody in mice in this study via the N-terminus of VP1 was deleted ($\Delta 60N_VP1$) and then fused with VP2. Therefore, the patterns of the recombinant proteins between the truncated VP1 and VP2 were engineered as follows: $\Delta 60N_VP1$, VP2, VP2/ $\Delta 60N_VP1$ and $\Delta 60N_VP1/VP2$. These four types of gene fragments were subsequently cloned into pET28a (+) expression vector in *E.coli* Roseta-gami. The recombinant clones were induced at 25 °C for 3 hr using 0.2 – 0.3 mM IPTG the inducing agent for the protein expression. The recombinant proteins were purified using affinity chromatography and gave rise to the molecular weight of 45, 28, 73 and 85 kDa for $\Delta 60N_VP1$, VP2, VP2/ $\Delta 60N_VP1$ and $\Delta 60N_VP1/VP2$, respectively. Because of $\Delta 60N_VP1$ strong antigenicity, it was chosen for development of CAV serodiagnostic test in 152 chicken serum samples using indirect ELISA, where the obtained sensitivity, selectivity and accuracy were 87.50%, 95.31% and 90.79%, respectively. In addition, polyclonal antibodies against $\Delta 60N_VP1$ was generated after $\Delta 60N_VP1$ was administered into mice reflecting that the animal can be immunized by this antigen. To this end, $\Delta 60N_VP1$ can be served as a good potential candidate for vaccine development and the antibody against $\Delta 60N_VP1$ generated in mice can be applied for a diagnostic tool for CAV detection in the foreseeable future.

Department: Microbiology

Student's Signature

Field of Study: Industrial Microbiology

Advisor's Signature

Academic Year: 2014

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลือของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันชัย อัครลาภสกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ที่คอยชี้แนะ และให้คำปรึกษา รวมถึงสอนเทคนิคต่างๆทางด้านชีวโมเลกุลและช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จ สมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ประธานกรรมการสอบ วิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาติลี สิริศรัทธา ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งช่วยให้ความคิดเห็นต่างๆ ทำให้ วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณสัตวแพทย์หญิง ดร. สุจิตรา ปาจริยานนท์ ที่ปรึกษากรมปศุสัตว์ (ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก) ที่ช่วยชี้แนะและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย รวมทั้งกรุณาเป็น กรรมการสอบวิทยานิพนธ์และให้ความคิดเห็นต่างๆ ทำให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ Associate Professor Dr. Meng-Shiou Lee (China Medical University, Taiwan) ที่ให้ความอนุเคราะห์ anti-VP1 และ anti-VP2 polyclonal antibody ที่ใช้ใน งานวิจัยนี้

ขอกราบขอบพระคุณนายสัตวแพทย์ สมชวน รัตนมังคลานนท์ อดีตผู้อำนวยการศูนย์วิจัย และพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออก (ศวพ ภาคตะวันออก) ที่ให้โอกาสได้มาศึกษาเพิ่มเติม และ นายสัตวแพทย์ เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล ผู้อำนวยการ ศวพ ภาคตะวันออก ที่ให้ความช่วยเหลือและ สนับสนุนงานวิจัยเป็นอย่างดี และขอขอบคุณ นางสาวนิภาพร กอแก้ว เจ้าหน้าที่กลุ่มงานไวรัสวิทยา และเจ้าหน้าที่ ศวพ ภาคตะวันออก ทุกคน ที่ช่วยเหลืองานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ น้องๆ ห้องวิจัย 2014 ภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ช่วยเหลือและสอนเทคนิคต่างๆ ที่ เกี่ยวข้องกับงานวิจัยด้านชีวโมเลกุลตลอดจนให้กำลังใจที่ดีเสมอมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ทุกคนในครอบครัวที่ให้การสนับสนุนด้านการศึกษา และให้กำลังใจมาโดยตลอด รวมทั้งขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคนที่ให้กำลังใจที่ดีเสมอมา

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจาก ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากกองทุน รัชดาภิเษกสมโภชน์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์ส่งเสริมการวิจัยในภูมิภาคเอเชียของมูลนิธิ เกาหลีเพื่อการศึกษาขั้นสูง 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 วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	18
บทที่ 4 วิธีดำเนินการทดลอง.....	25
4.1 สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด.....	25
4.2 โคลนยีนที่เกี่ยวข้อง.....	30
4.3 สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดสำหรับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน.....	39
4.4 แสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในแบคทีเรีย <i>E.coli</i>	44
4.5 ทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์.....	50
4.6 ประยุกต์ใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CAV ด้วยวิธี indirect enzyme linked immunosorbant assay (indirect ELISA).....	54
4.7 ประยุกต์ใช้โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ สำหรับผลิตพอลิโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ในหนูไม่ซ้.....	61
บทที่ 5 ผลการทดลอง.....	62
5.1 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด.....	62
5.1.1 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดรูปแบบที่ 1 : pET28- $\Delta 60N_VP1$	63
5.1.2 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดรูปแบบที่ 2 : pET28 -VP2.....	67

5.1.3 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดรูปแบบที่ 3 : pET28-VP2/ Δ 60N_VP1	70
5.1.4 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดรูปแบบที่ 4 : pET28- Δ 60N_VP1/VP2.....	75
5.1.5 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดรูปแบบที่ 5 : pET28-VP2/Full length VP1	80
5.2 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในแบคทีเรีย <i>E.coli</i>	83
5.2.1 ผลการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน Δ 60N_VP1.....	84
5.2.2 ผลการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2.....	92
5.2.3 ผลการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1	99
5.2.4 ผลการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน Δ 60N_VP1/VP2	106
5.2.5. ผลการยืนยันการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP1 และ VP2	114
5.3. การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนของเชื้อไวรัส CAV ให้บริสุทธิ์.....	116
5.3.1 การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีคุณสมบัติการละลาย (soluble form) ให้บริสุทธิ์ ...	116
5.3.2 การทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่คุณสมบัติไม่ละลาย (Insoluble form) บริสุทธิ์	118
5.3.3 ผลการยืนยันรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP1 และ VP2 ที่บริสุทธิ์	124
5.4 การหาความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยวิธี Bradford assay	127
5.5 การคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของรีคอมบิแนนท์โปรตีน Δ 60N_VP1	131
5.6 การประยุกต์ใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน Δ 60N_VP1 สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CAV ด้วยวิธี indirect enzyme linked immunosorbant assay (indirect ELISA).....	132
5.6.1 การหาความเหมาะสมของวิธีด้วย checkerboard titration assay (CBT).....	132
5.6.2 การหาค่า Cut off ของวิธี indirect ELISA	136
5.6.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี indirect ELISA กับวิธีของชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูปยี่ห้อ IDEXX.....	137
5.7 การประยุกต์ใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน Δ 60VP1 สำหรับผลิตพอลิโคลนัลแอนติบอดี.....	140
บทที่ 6 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	144

รายการอ้างอิง..... 150

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 174



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 แบบที่เรียที่ใช้ในการทดลอง.....	18
ตารางที่ 3.2 สัตว์ทดลองที่ใช้ในการทดลอง.....	18
ตารางที่ 3.3 คุณลักษณะของพลาสติกที่ใช้ในการทดลอง.....	18
ตารางที่ 3.4 เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการทดลอง.....	21
ตารางที่ 3.5 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทดลอง.....	22
ตารางที่ 3.6 วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	24
ตารางที่ 4.1 โปรแกรมอนุกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน VP2, ยีน VP2_Front และยีน VP2_Back.....	31
ตารางที่ 4.2 โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน $\Delta 60N_VP1$, $\Delta 60N_VP1_Front$ และ $\Delta 60N_VP1_Back$	32
ตารางที่ 4.3 โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน Full length VP1.....	33
ตารางที่ 4.4 โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน Syn_VP1.....	35
ตารางที่ 4.5 การเตรียมเจล SDS สำหรับวิเคราะห์โปรตีน.....	45
ตารางที่ 4.6 แสดงการเคลือบไมโครเพลทด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ที่ปริมาณต่างๆ..	54
ตารางที่ 4.7 แสดงการเจือจางตัวอย่างซีรัมที่ระดับต่างๆ ในแต่ละคอลัมน์ของไมโครเพลท.....	55
ตารางที่ 4.8 แสดงการเจือจางสารคอนจูเกตที่ระดับต่างๆ ในแต่ละคอลัมน์ของไมโครเพลท.....	56
ตารางที่ 4.9 แสดงการเปรียบเทียบผลทดสอบการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CAV ในตัวอย่างซีรัมไก่ด้วยวิธี indirect ELISA และชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูปยี่ห้อ IDEXX.....	59
ตารางที่ 5.1 สรุปรีคอมบิแนนท์โคลนที่เลือกนำมาใช้, สภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน รวมทั้งคุณสมบัติการละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้ง 4 ชนิดที่แสดงออก.....	113

ตารางที่ 5.2 สรุปผลการทดสอบความจำเพาะของรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้ง 4 ชนิดที่แสดงออกกับแอนติบอดีปฐมภูมิชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Western blotting analysis..... 115

ตารางที่ 5.3 สรุปผลการทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้ง 4 ชนิดบริสุทธิ์..... 123

ตารางที่ 5.4 ปริมาณทั้งหมดของรีคอมบิแนนท์โปรตีน Δ60N_VP1 บริสุทธิ์ ใน PCE elution buffer ที่มี imidazole ความเข้มข้นต่างๆ 126

ตารางที่ 5.5 แสดงผลการวัดความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีน Δ60N_VP1 สำหรับใช้เป็นโปรตีนแอนติเจนในวิธี indirect ELISA ด้วยวิธี Bradford assay..... 127

ตารางที่ 5.6 แสดงผลการวัดความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีน Δ60N_VP1 สำหรับใช้เป็นโปรตีนแอนติเจนในการผลิตแอนติบอดีด้วยวิธี Bradford assay 129

ตารางที่ 5.7 แสดงผลการหาปริมาณแอนติเจนและระดับการเจือจางของซีรัมที่เหมาะสมที่ระดับต่างๆ..... 133

ตารางที่ 5.8 แสดงผลการหาระดับการเจือจางของสารคอนจูเกตที่เหมาะสมที่ระดับต่างๆ 134

ตารางที่ 5.9 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้นกับชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูปยี่ห้อ IDEXX 138

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 2.1 โครงสร้างของเชื้อไวรัสก่อโรคโลหิตจางในไก่.....	5
รูปที่ 2.2 ลักษณะและการจัดเรียงจีโนมของเชื้อไวรัสก่อโรคโลหิตจางในไก่.....	6
รูปที่ 2.3 วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสก่อโรคโลหิตจางในไก่	9
รูปที่ 2.4 เซลล์เป้าหมายสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัส CAV.....	10
รูปที่ 3.1 พลาสมิด pGEM [®] -T Easy (Promega).....	19
รูปที่ 3.2 พลาสมิด pET-28a (+) (Novagen).....	20
รูปที่ 4.1 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28 - Δ 60N_VP1.....	25
รูปที่ 4.2 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28 - VP2.....	26
รูปที่ 4.3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28 - VP2/ Δ 60N_VP1.....	27
รูปที่ 4.4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28 - Δ 60N_VP1/VP2.....	28
รูปที่ 4.5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28 - VP2/Full length VP1.....	29
รูปที่ 4.6 การเพิ่มจำนวนชิ้นยีน Syn_VP1 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบซ้อนทับ (Overlapping PCR).....	34
รูปที่ 5.1 ผลของการรันอะกาโรสเจล 1% ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Δ 60N_VP1 และผลของการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28- Δ 60N_VP1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Nde</i> I และ <i>Xho</i> I.....	63
รูปที่ 5.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Δ 60N_VP1 ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pET28a.....	65
รูปที่ 5.3 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Δ 60N_VP1 ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pET28a.....	66
รูปที่ 5.4 ผลของการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28-VP2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Nde</i> I และ	67
รูปที่ 5.5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP2 ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pET28a.....	68
รูปที่ 5.6 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP2 ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pET28a.....	69

รูปที่ 5.7 ผลของการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28-VP2/ Δ 60N_VP1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ต่างๆ.....	71
รูปที่ 5.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP2/ Δ 60N_VP1 ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pET28a.....	72
รูปที่ 5.9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP2/ Δ 60N_VP1 ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pET28a (ต่อเนื่อง)....	73
รูปที่ 5.10 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP2/ Δ 60N_VP1 ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pET28a	74
รูปที่ 5.11 ผลของการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28- Δ 60N_VP1/VP2 ด้วยเอนไซม์ตัด จำเพาะต่างๆ.....	76
รูปที่ 5.12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Δ 60N_VP1/VP2 ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pET28a.....	77
รูปที่ 5.13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Δ 60N_VP1/VP2 ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pET28a (ต่อเนื่อง)..	78
รูปที่ 5.14 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Δ 60N_VP1/VP2 ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pET28a	79
รูปที่ 5.15 ผลของการรันอะกาโรสเจล 1% ของผลิตภัณฑ์ PCR ของชิ้นส่วนยีน Syn_VP1 ที่เกิด จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบซ้อนทับ (overlapping PCR)	80
รูปที่ 5.16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Syn_VP1 ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pGEM [®] -T easy vector.....	81
รูปที่ 5.17 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Syn_VP1 ที่เชื่อม เข้ากับพลาสมิด pGEM [®] -T easy vector.....	81
รูปที่ 5.18 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดจากเซลล์ <i>E.coli</i> รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 - Δ 60N_VP1 จำนวน 7 โคลนที่ถูกชักนำด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG ที่อุณหภูมิ 30 ° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง.....	84
รูปที่ 5.19 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ <i>E.coli</i> รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 - Δ 60N_VP1 จำนวน 3 โคลน ที่ถูกชักนำด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG ที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง.....	85
รูปที่ 5.20 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของการทดสอบคุณสมบัติการ ละลายของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ <i>E.coli</i> รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 - Δ 60N_VP1 โคลนที่ 3 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิต่างๆ	89

- รูปที่ 5.21** SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E.coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 - Δ 60N_VP1 โคลนที่ 3 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25° ซ เมื่อใช้ระยะเวลาในการชักนำต่างๆ..... 90
- รูปที่ 5.22** SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E.coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28–VP2 จำนวน 7 โคลน ที่ถูกชักนำด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG ที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง..... 92
- รูปที่ 5.23** SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E.coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 –VP2 จำนวน 3 โคลน ที่ถูกชักนำด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG ที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง..... 93
- รูปที่ 5.24** SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E.coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 –VP2 โคลนที่ 4 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 94
- รูปที่ 5.25** SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E.coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 –VP2 โคลนที่ 4 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิต่างๆ..... 95
- รูปที่ 5.26** SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของการทดสอบคุณสมบัติการละลายของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E.coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 –VP2 โคลนที่ 4 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิต่างๆ..... 97
- รูปที่ 5.27** SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E.coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 –VP2 โคลนที่ 4 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25° ซ เมื่อใช้ระยะเวลาในการชักนำต่างๆ..... 98
- รูปที่ 5.28** SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E.coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28–VP2/ Δ 60N_VP1 โคลนที่ 2 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 101
- รูปที่ 5.29** SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E.coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 –VP2/ Δ 60N_VP1 โคลนที่ 2 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิต่างๆ 102

รูปที่ 5.30 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของการทดสอบคุณสมบัติการละลายของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ <i>E.coli</i> รีคอมบิแนนท์โคลน pET28-VP2/ Δ 60N_VP1 โคลนที่ 2 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิต่างๆ.....	103
รูปที่ 5.31 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ <i>E.coli</i> รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -VP2/ Δ 60N_VP1 โคลนที่ 2 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25° ซ เมื่อใช้ระยะเวลาในการชักนำต่างๆ.....	104
รูปที่ 5.32 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ <i>E.coli</i> รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 - Δ 60N_VP1/ VP2 จำนวน 7 โคลน ที่ถูกชักนำด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG ที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง.....	106
รูปที่ 5.33 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ <i>E.coli</i> รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 - Δ 60N_VP1/ VP2 จำนวน 3 โคลน ที่ถูกชักนำด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG ที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง.....	107
รูปที่ 5.34 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ <i>E.coli</i> รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 - Δ 60N_VP1/ VP2 โคลนที่ 3 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง	108
รูปที่ 5.35 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ <i>E.coli</i> รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 - Δ 60N_VP1/ VP2 โคลนที่ 3 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิต่างๆ	109
รูปที่ 5.36 ผลการวิเคราะห์ SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) โดยใช้ Anti-His Tag Antibody (1:4,000) (B) Anti-VP1 Polyclonal Antibody (1:5,000) (C) Anti-VP2 Polyclonal Antibody (1:5,000) (D) ของการแสดงออกรีคอมบิแนนท์โปรตีนของรีคอมบิแนนท์โคลนที่เหมาะสมทั้ง 4 ชนิด ตามสภาวะที่เหมาะสมต่อการชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่เหมาะสม	114
รูปที่ 5.37 ผลการวิเคราะห์ SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 เมื่อทำให้บริสุทธิ์	117

รูปที่ 5.38	ผลการวิเคราะห์ SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ เมื่อทำให้บริสุทธิ์.....	119
รูปที่ 5.39	ผลการวิเคราะห์ SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ $\Delta 60N_VP1$ เมื่อทำให้บริสุทธิ์.....	120
รูปที่ 5.40	ผลการวิเคราะห์ SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ เมื่อทำให้บริสุทธิ์.....	122
รูปที่ 5.41	ผลการวิเคราะห์ SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) โดยใช้ Anti-His Tag Antibody (1:4,000) (B) Anti-VP1 Polyclonal Antibody (1:5,000) (C) Anti-VP2 Polyclonal Antibody (1:5,000) (D) ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ทั้ง 4 ชนิด.....	124
รูปที่ 5.42	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของโปรตีน (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (แกน Y) โดยใช้โปรตีนมาตรฐานเป็น BSA ที่มีความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ สำหรับพัฒนาวิธีตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CAV	128
รูปที่ 5.43	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของโปรตีน (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (แกน Y) โดยใช้โปรตีนมาตรฐานเป็น BSA ที่มีความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ สำหรับผลิตพอลิโคลนัลแอนติบอดี	130
รูปที่ 5.44	กราฟ two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC) analysis สำหรับหาค่า Cut off ของวิธี indirect ELISA.....	136
รูปที่ 5.45	กราฟแสดงผลการหาระดับไตเตอร์ของพอลิโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60VP1$ A) หนูไมซ์ตัวที่ 1 B) หนูไมซ์ตัวที่ 2 ด้วยวิธี indirect ELISA	141
รูปที่ 5.46	ผลการทดสอบความจำเพาะของพอลิโคลนัลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ของหนูไมซ์ ด้วยการวิเคราะห์ SDS-PAGE และ Western blotting analysis.....	142

ตัวย่อ

ELISA	=	enzyme linked immunosorbance assay
Hr	=	hr(s)
HRP	=	horse radish peroxidase
IgG	=	immunoglobulin G
IPTG	=	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
kb	=	kilobase (s)
kDa	=	kilodalton (s)
M	=	molar
μ M	=	micromolar
min	=	minute(s)
ml	=	milliliter
μ l	=	microliter
mM	=	millimolar
ng	=	nanogram
ORF	=	open reading frame (s)
PCR	=	polymerase chain reaction
PVDF	=	polyvinylidene difluoride
rpm	=	revolution per minute
SDS-PAGE	=	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	=	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-ethane-1,2-diamine
T_m	=	melting temperature
V	=	volt (s)
v/v	=	volume/volume
w/v	=	weight/volume

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ของประเทศไทยเป็นอุตสาหกรรมหนึ่งที่มีการผลิตแปรรูปและส่งออกในปริมาณสูง โดยในปี พ.ศ. 2557 มีปริมาณไก่ส่งออกทั้งเนื้อไก่แปรรูปและเนื้อไก่แช่เย็นหรือแช่แข็ง จำนวน 467,242.060 ตัน คิดเป็นมูลค่าส่งออก จำนวน 65,225.576 ล้านบาท และมีแนวโน้มในการขยายตัวอย่างต่อเนื่องในปี พ.ศ. 2558 อย่างไรก็ตามการระบาดของโรคสัตว์ปีกยังเป็นปัจจัยที่สำคัญอันก่อให้เกิดผลกระทบต่ออุตสาหกรรมสัตว์ปีกอย่างมาก เช่น การระบาดของโรคไข้หวัดนก ในปี พ.ศ. 2547 ซึ่งมีผลทำให้ประเทศคู่ค้าหลายๆประเทศของไทยได้ห้ามนำเข้าไก่แช่เย็นหรือแช่แข็งจากประเทศไทย จึงสูญเสียรายได้ให้แก่ประเทศมูลค่ามหาศาล [1]

โรคโลหิตจางในไก่ เป็นโรคระบาดหนึ่งที่พบในสัตว์ปีก ทำให้ไก่ที่ติดเชื้อนั้นสามารถก่อโรคและทำให้ไก่มีอัตราการป่วยและตายสูงได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม นอกจากนี้ไก่ที่ติดเชื้อยังส่งผลต่อน้ำหนักและผลผลิตของไก่ที่ลดลงจึงก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่และสร้างความสูญเสียต่อเศรษฐกิจเป็นอย่างมากซึ่งสาเหตุหลักเกิดจากการติดเชื้อไวรัส Chicken Anemia Virus (CAV) โดยเชื้อไวรัสดังกล่าวสามารถเพิ่มจำนวนและทำลายเซลล์ต้นกำเนิดที่จะพัฒนาต่อไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือด รวมทั้งเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายสัตว์ส่งผลให้ไก่มีภาวะภูมิคุ้มกันที่บกพร่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในลูกไก่จะพบการแสดงออกของโรคที่รุนแรงและส่งผลให้อัตราการป่วยและตายสูง ในขณะที่ไก่มีอายุหรือไก่พ่อแม่พันธุ์แม้ไม่พบการแสดงออกของโรค แต่พบภาวะภูมิคุ้มกันทำงานลดลงซึ่งส่งผลทำให้เกิดการติดเชื้อก่อโรคอื่นๆ อาทิ ไวรัส แบคทีเรียและเชื้อรา เป็นต้น ดังนั้นยังส่งต่อการตอบสนองของวัคซีนป้องกันโรคอื่นๆ ลดลง จึงเป็นสาเหตุสำคัญอีกประการหนึ่งซึ่งทำให้อัตราการป่วยและตายเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นแนวทางการควบคุมและป้องกันการระบาดของโรคโลหิตจางในไก่ จึงจำเป็นต้องอาศัยการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการเพื่อคัดแยกสัตว์ติดเชื้อออกจากฝูง การตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสก่อโรคโลหิตจางในไก่เป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งโดยเฉพาะอย่างยิ่งก่อนการฟักไข่เพื่อป้องกันการแพร่กระจายเชื้อไวรัสจากแม่สู่ลูก

ปัจจุบันการพัฒนาวิธีหรือชุดสอบในการตรวจวินิจฉัยโรคหรือตรวจหาระดับแอนติบอดีของเชื้อไวรัสด้วยเทคนิคทางอิมมูโนวิทยานิยมใช้เทคโนโลยีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยอาศัยสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์หรือพืช เป็นต้น ในการผลิตแอนติเจนทดแทนการใช้อนุภาคไวรัสที่เพาะเลี้ยงขึ้นจากห้องปฏิบัติการ ซึ่งช่วยในการลดเวลาและขั้นตอนความยุ่งยาก อีกทั้งยังลดต้นทุนการผลิต อย่างไรก็ตามการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากแคพซิดโปรตีนหรือโปรตีน VP1 ของเชื้อไวรัสโกลีตจางในไก่เพื่อใช้เป็นแอนติเจนโดยอาศัยเซลล์แบคทีเรียซึ่งสามารถเจริญได้ง่าย ต้นทุนต่ำ และให้ปริมาณโปรตีนสูง เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP1 รวมทั้งออกแบบและตัดต่อโปรตีน VP1 เข้ากับโปรตีน VP2 ของเชื้อไวรัสโกลีตจางในไก่เพื่อช่วยในการแสดงออกของโปรตีน VP1 ในแบคทีเรีย รวมถึงการนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP1 ที่ผลิตได้ไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโกลีตจางในไก่ ตลอดจนการนำไปผลิตแอนติบอดีสำหรับใช้ตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสโกลีตจางในไก่

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้รีคอมบิแนนท์โปรตีน VP1 และ VP2 จากเชื้อไวรัสโกลีตจางในไก่ที่สามารถแสดงออกในแบคทีเรีย *Escherichia coli*
2. ได้วิธีการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโกลีตจางในไก่จากรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP1
3. ได้พอลิโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสโกลีตจางในไก่

บทที่ 2

ปรีทรรศน์วรรณกรรม

2.1 โรคโลหิตจางในไก่

โรคโลหิตจางในไก่ (Chicken Infectious Anemia หรือ CIA) เกิดจากการติดเชื้อไวรัสก่อโรคโลหิตจางในไก่ (Chicken Anemia Virus หรือ CAV) ซึ่งเดิมเรียกว่า Chicken Anemia Agent หรือ CAA เนื่องจากยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นเชื้อโรคชนิดใดแต่พบว่าสามารถทำให้ไก่เกิดภาวะของโรคโลหิตจางชนิดรุนแรง (aplastic anemia) ได้ ซึ่งต่อมาได้มีการศึกษาถึงลักษณะโครงสร้างและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ CAA อย่างถ่องแท้ จนพบว่า Chicken Anemia Virus หรือ CAV เป็นสาเหตุที่ก่อโรคโลหิตจางในไก่โดยได้ตั้งชื่อตามระบบสากลที่ International Committee for the Taxonomy of Viruses ยอมรับ อย่างไรก็ตามท้องถิ่นมักเรียกชื่อไวรัสให้สอดคล้องกับโรคที่พบจึงมีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Chicken Infectious Anemia Virus หรือ CIAV [2]

2.1.1 ประวัติความเป็นมาของโรค

ในปี ค.ศ. 1970 มีรายงานการพบรอยโรคอันเกิดจากเชื้อชนิดหนึ่งไม่ทราบแน่ชัด สันนิษฐานว่าเป็นเชื้อไวรัส CAV ในภายหลัง ซึ่งทำให้เกิดภาวะ haematopoietic destruction ในไก่ที่ติดเชื้อ Marek's disease [3] ต่อมาในปี ค.ศ. 1979 โดย Yuasa ได้ทำการแยกเชื้อไวรัส CAV (สายพันธุ์ Gifu-1) และทำการทดลองศึกษาพยาธิสภาพของโรคเป็นครั้งแรกในประเทศญี่ปุ่น [4] จากนั้นได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส CAV ในหลอดทดลองได้สำเร็จในปี ค.ศ. 1983 โดยพบว่าเชื้อ CAV สามารถเจริญได้ในเซลล์ Chicken lymphoblastoid cell lines ที่เตรียมได้จาก Marek's disease chicken cell (MDCC) – MSBI และ LSCC-1104B1 ซึ่งสามารถก่อให้เกิดพยาธิสภาพภายในเซลล์ (cytopathic effects) ได้ [5] จากการค้นพบวิธีดังกล่าวจึงทำให้เกิดการพัฒนาทั้งวิธีการตรวจวินิจฉัยโรค รวมถึงการศึกษาทางด้านระบาดวิทยาของโรคและการก่อโรคของเชื้อไวรัส CAV มากขึ้นตั้งแต่ปี ค.ศ. 1990 เป็นต้นมา นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาและพัฒนาวิธีตรวจวินิจฉัย และวัคซีนต่าง ๆ กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน [2]

2.1.2 อาการของโรค

การแสดงอาการของโรค CIA สามารถแบ่งได้ตามช่วงอายุของสัตว์ที่ได้รับเชื้อ ดังนี้คือ

2.1.2.1 อาการของโรคในระหว่างการติดเชื้อในลูกไก่น้อยกว่า 2 - 3 สัปดาห์

การติดเชื้อในลูกไก่น้อยกว่า 2 - 3 สัปดาห์ มักพบการแสดงอาการของโรคได้อย่างชัดเจน ได้แก่ มีอาการซีด, แคระแกร็น, มีภาวะโลหิตจางอย่างรุนแรง, เซลล์ไขกระดูกสันหลังลดลง, เกิดเลือดออกตามใต้ผิวหนัง, ต่อมไธมัสและต่อมเบอริช่าฝ่อ, ค่า hematocrit ลดลง 6-27 % [6] โดยอาการดังกล่าวเริ่มพบและปรากฏอย่างรุนแรงในลูกไก่ติดเชื้อที่มีช่วงอายุ 10-12 วัน ทำให้อัตราการตายเริ่มเพิ่มสูงขึ้น เมื่อลูกไก่มีอายุ 17-21 วันเป็นช่วงที่พบอัตราการตายสูงที่สุด จากนั้นอัตราการตายจะเริ่มลดลงและเข้าสู่ภาวะปกติเมื่อไก่มีอายุ 23-26 วัน [7]

2.1.2.2 อาการของโรคในระหว่างการติดเชื้อในไก่ที่มีอายุมากกว่า 2 - 3 สัปดาห์

ขึ้นไป

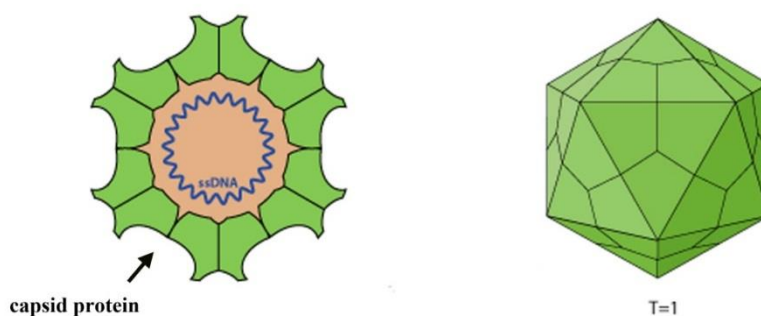
การติดเชื้อในไก่ที่มีอายุมากกว่า 2 - 3 สัปดาห์ขึ้นไปมักพบการติดเชื้อในรูปแบบไม่แสดงอาการของโรค (Subclinical infection) โดยการศึกษาของ McConnell และคณะ (1993) พบว่าการทำงานของเซลล์ lymphocyte และเซลล์เม็ดเลือดขาวลดลงในไก่ติดเชื้อที่มีอายุ 3 สัปดาห์ [8] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Markowski-Grimsrud และ Schat (2003) พบว่าไก่ติดเชื้อที่มีอายุ 14-21 วัน มีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของ cytotoxic T lymphocytes (CTL) ลดลงแสดงถึงภาวะภูมิคุ้มกันที่บกพร่องซึ่งส่งผลให้สัตว์มีโอกาสติดเชื้อร่วมกับเชื้อโรคอื่นๆได้ง่าย โดยพบว่าไก่ติดเชื้อไวรัส CAV มีโอกาสติดเชื้อร่วมกับไวรัสชนิดอื่นๆ สูงขึ้น อาทิ เช่น Marek's disease virus [9], reticuloendotheliosis virus (REV), infectious bursal disease virus, reovirus หรือ adenovirus [10] ซึ่งส่งผลทำให้เกิดการแสดงอาการของโรคที่รุนแรงและส่งผลให้อัตราการตายเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ยังส่งผลให้การตอบสนองของวัคซีนป้องกันโรคบางชนิดลดลง อาทิ เช่น Marek's disease [11], Newcastle disease [12] และ infectious laryngotracheitis [13] ดังนั้นอัตราการตายของไก่ติดเชื้อที่มีอายุมากส่วนใหญ่จึงมักเกิดจากการติดเชื้อชนิดอื่นร่วมด้วย นอกจากนี้โรค CIA ยังส่งผลให้ไก่มีน้ำหนักและให้ผลิตภัณฑ์ลดลง [14]

2.2 ลักษณะของเชื้อไวรัสก่อโรคโลหิตจางในไก่

เชื้อไวรัสก่อโรคโลหิตจางในไก่ (Chicken Anemia Virus หรือ CAV) จัดอยู่ใน Family Circoviridae เช่นเดียวกับไวรัสก่อโรคในสัตว์ชนิดอื่นๆ ได้แก่ Porcine circovirus-1 (PCV1), Porcine circovirus-2 (PCV2), Beak and feather disease virus (BFDV), Duck circovirus (DuCV), Canary circovirus (CaCV) เป็นต้น แต่เป็นไวรัสชนิดเดียวที่จัดอยู่ใน Genus Gyrovirus เนื่องจากมีลักษณะจีโนมของไวรัสเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวต่อกันเป็นวงกลมประจุลบ (negative sense - circular single stranded DNA) ซึ่งแตกต่างจากไวรัสชนิดอื่นในสกุลเดียวกันซึ่งมีลักษณะจีโนมของไวรัสเป็น ambisense - circular single stranded DNA [15]

2.2.1 โครงสร้างของไวรัส

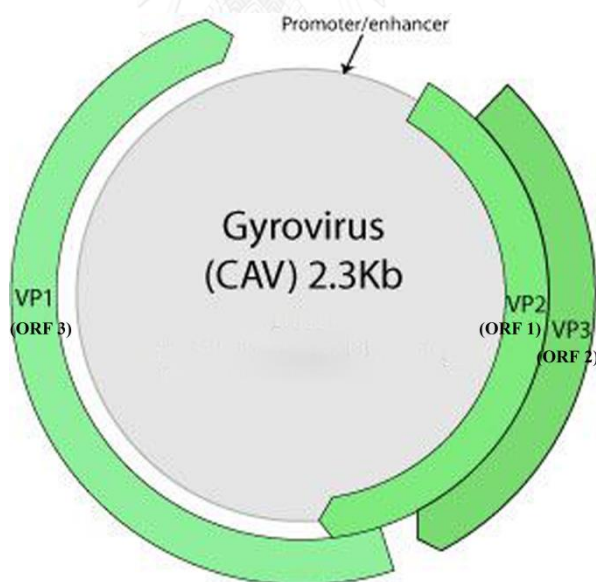
ไวรัส CAV เป็นไวรัสขนาดเล็กที่ไม่มีเปลือกหุ้มภายนอก (non-enveloped virus) โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ประมาณ 25 นาโนเมตร มีรูปร่าง icosahedral symmetry ประกอบด้วยโปรตีนแคปซิด จำนวน 60 หน่วย ($T=1$) จัดเรียงในลักษณะ pentameric ring จำนวน 12 วงแหวน ดังแสดงในรูปที่ 2.1 [15] ชั้นแคปซิดของไวรัสไม่มีคาร์โบไฮเดรตและไขมันเป็นองค์ประกอบจึงทำให้ไวรัสมีความทนทานต่อสารเคมี, อุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างสูง จึงทำให้ยากต่อการ inactivated เชื้อไวรัสชนิดนี้ [16]



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของเชื้อไวรัสก่อโรคโลหิตจางในไก่ [17]

2.2.2 ลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัส

จีโนมของเชื้อไวรัส CAV มีลักษณะเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวต่อกันเป็นวงกลม ประจุลบ (negative sense - circular single stranded DNA) มีขนาดประมาณ 2.3 กิโลเบส มีส่วนต่างๆ ได้แก่ ส่วน coding gene ประกอบด้วย open reading frame (ORF) จำนวน 3 ORFs ซ้อนทับกัน ได้แก่ ORF1, ORF2 และ ORF3 โดย ORF2 ซ้อนทับอยู่ใน ORF1 ทั้งหมด ในขณะที่ ORF1 ซ้อนทับกับ ORF3 ในบางส่วน ดังแสดงในรูป 2.2 ซึ่งถอดรหัสพันธุกรรม ภายใต้การทำงานของโปรโมเตอร์เดี่ยวที่ประกอบด้วย TATA-box และ poly A signal ได้สาย mRNA สายเดี่ยวในลักษณะ polycistronic mRNA ซึ่งภายหลังพบว่าสาย mRNA สายยาวซึ่งได้จากการบวนการถอดรหัสดังกล่าวถูกตัดแบบ alternative splicing ในภายหลังก่อนเข้าสู่กระบวนการแปลรหัสโปรตีนเป็นโปรตีน 3 ชนิด คือ VP2, VP3 และ VP1 ตามลำดับ [18] นอกจากนี้ยังมีส่วนที่ไม่ถูกถอดรหัสพันธุกรรม (non-transcribed region หรือ NTR) ซึ่งเป็นส่วนของ promoter/enhancer ซึ่งประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 19 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำๆกันในลักษณะ tandem repeats เป็นตำแหน่งในการเข้าจับของ promoter/enhancer element เพื่อควบคุมกระบวนการถอดรหัสพันธุกรรม [15]



รูปที่ 2.2 ลักษณะและการจัดเรียงจีโนมของเชื้อไวรัสก่อโรคโลหิตจางในไก่ [17]

2.2.3 โปรตีนที่สำคัญของไวรัส

ไวรัส CAV ประกอบด้วยโปรตีนทั้งหมด 3 ชนิด ดังนี้คือ

2.2.3.1 โปรตีน VP1

เป็นโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) หรือแคพซิดโปรตีน มีขนาดประมาณ 52 กิโลดาลตัน (kDa) ถูกแปลรหัสกรดอะมิโนจาก ORF3 ซึ่งมีขนาด ORF ใหญ่ที่สุด [19] โปรตีน VP1 เป็นโปรตีนหลักที่แสดงคุณสมบัติของความเป็นแอนติเจน (antigenicity) โดยบริเวณด้านปลาย N-terminal ของโปรตีน VP1 มีกรดอะมิโนจำนวน 100 กรดอะมิโนแรก มีคุณสมบัติเป็น hydrophilic [20] และพบกรดอะมิโนชนิดอาร์จินีนอยู่มากที่บริเวณกรดอะมิโน 40-50 กรดอะมิโนแรก จึงมีคุณสมบัติมีประจุบวกสูงและสามารถจับกับดีเอ็นเอของไวรัสเพื่อห่อหุ้มจีโนมของไวรัสซึ่งคล้ายคลึงกับโปรตีนฮิสโตน [19], [21] ส่วนปลายด้าน C-terminal ของโปรตีน VP1 ประกอบด้วย replication motif จึงเกี่ยวข้องกับการกระบวนการ rolling cycle replication (RCR) ของกระบวนการเพิ่มจำนวนของเชื้อไวรัส CAV [22], [23]

2.2.3.2 โปรตีน VP2

เป็นโปรตีนชนิดที่ไม่ใช่โปรตีนโครงสร้าง (non-structural protein) มีขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตัน (kDa) ถูกแปลรหัสกรดอะมิโนจาก ORF1 [24] เป็นโปรตีนที่มีบทบาทเป็น chaperone หรือ scaffold protein ของโปรตีน VP1 ซึ่งช่วยในการประกอบโครงสร้างของอพิโทไวรัสบนโปรตีน VP1 ให้มีความถูกต้อง [25], [26] นอกจากนี้ยังเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็น dual specificity protein phosphatase (DSP) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมเพิ่มจำนวนและการก่อโรคของไวรัส [24]

2.2.3.3 โปรตีน VP3

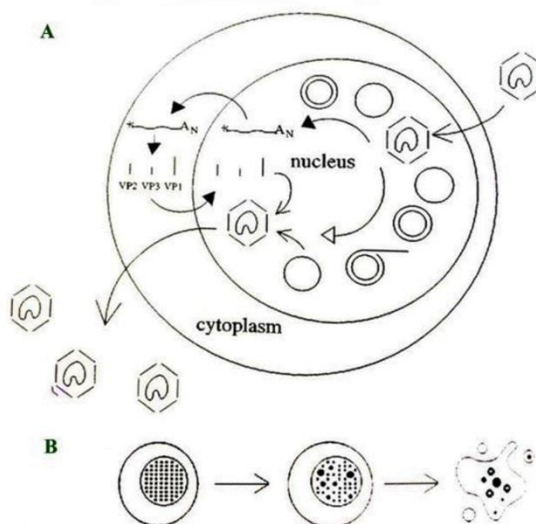
เป็นโปรตีนชนิดที่ไม่ใช่โปรตีนโครงสร้าง (non-structural protein) เช่นเดียวกับโปรตีน VP2 มีขนาดประมาณ 13 กิโลดาลตัน (kDa) ถูกแปลรหัสกรดอะมิโนจาก ORF2 โปรตีน VP3 หรือ โปรตีน apoptin เป็นโปรตีนที่สามารถชักนำให้เซลล์สัตว์ที่ติดเชื้อไวรัส CAV เกิดกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis ได้ โดยโปรตีน VP3 มีกรดอะมิโนจำนวน 121 กรดอะมิโน ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งชนิด proline, serine และ threonine และด้านปลาย C-terminal ของโปรตีน VP3 มีคุณสมบัติเป็นประจุบวกซึ่งสามารถจับกับกรดนิวคลีอิกของเซลล์เจ้าบ้านได้ ภายหลังจากเข้าจับของโปรตีน VP3 บนโครมาตินจึงเกิดการทำลายโครงสร้าง supercoil ของโครมาติน ทำให้เกิดกระบวนการ apoptosis ในลำดับต่อมา นอกจากนี้โปรตีน VP3 อาจเป็น transcriptional regulator ของยีนของเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งส่งผลทำให้เกิด apoptosis ได้เช่นกัน [27], [28]

2.2.4 คุณสมบัติของไวรัส

โครงสร้างของไวรัส CAV ไม่มีคาร์โบไฮเดรตและไขมันเป็นองค์ประกอบจึงทำให้ไวรัสมีความสามารถทนต่อสารเคมี เช่น ether และ chloroform เป็นต้น นอกจากนี้ยังทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิสูง เช่น 80° ซ นาน 15 นาที และ 70° ซ นาน 1 ชั่วโมง อีกทั้งยังทนต่อความเป็นกรดที่ pH 3 นาน 3 ชั่วโมง [4] รวมถึงน้ำยาฆ่าเชื้อต่างๆ เช่น amphoteric soap, invert soap, organic solvent และ orthodichorobenzene [29]

2.4 วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสก่อโรคโลหิตจางในไก่

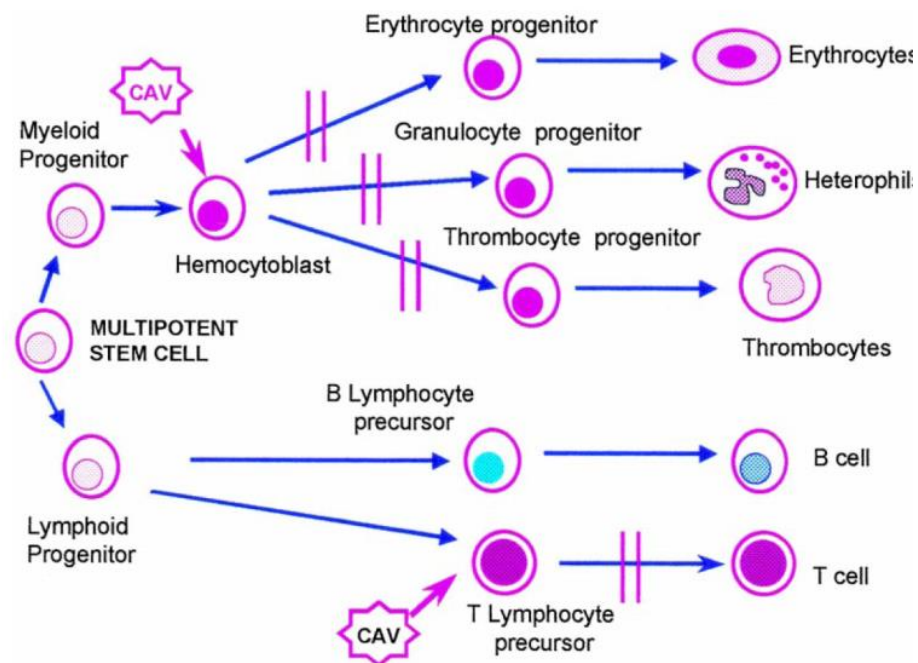
เมื่อสัตว์ได้รับเชื้อไวรัส CAV เข้าสู่ร่างกาย เชื้อจะกระจายไปตามอวัยวะต่างๆ ของสัตว์และเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย คือ เซลล์ progenitor stem cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่จะพัฒนาต่อไปเป็นเซลล์เม็ดเลือดต่างๆ ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์เกล็ดเลือด [30] โดยอาศัยกระบวนการหรือตัวรับที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส CAV บนผิวเซลล์ใต้นั้นยังไม่ทราบเป็นที่แน่ชัด [16] เมื่อไวรัสเข้าสู่ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ โปรตีนแคพซิดซึ่งห่อหุ้มจีโนมของไวรัสจะถูกแยกออกจากนั้นจีโนมของไวรัสจะถูกนำเข้าสู่นิวเคลียสและเกิดกระบวนการจำลองสารพันธุกรรม (Replication) โดยอาศัยกระบวนการ rolling cycle replication หรือ RCR และอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ของเซลล์เจ้าบ้าน ในช่วงระยะการแบ่งเซลล์ S - phase ทำให้เกิด replicative form ในลักษณะดีเอ็นเอวงกลมสายคู่ (circular double stranded DNA หรือ circular dsDNA) สำหรับเป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอสายเดี่ยวของไวรัสและเกิดกระบวนการถอดรหัสได้สาย mRNA โดย mRNA ที่ถูกสร้างขึ้นในขั้นนี้จะถูกส่งออกไปยังไซโตพลาสซึมเพื่อแปลรหัสเป็นโปรตีน 3 ชนิด ได้แก่ VP1 VP2 และ VP3 ตามลำดับ จากนั้นโปรตีนทั้งสามจะเข้าสู่นิวเคลียสโดยโปรตีน VP1 หรือโปรตีนแคพซิดจะห่อหุ้มจีโนมของไวรัสที่ถูกเพิ่มจำนวน จากนั้นอนุภาคไวรัสจะถูกส่งออกไปยังไซโตพลาสซึมและปล่อยออกนอกเซลล์ด้วยการทำให้เซลล์แตก (cell lysis) ดังแสดงในรูปที่ 2.3A และ 2.3B [15],[26] อย่างไรก็ตามพบว่า circular dsDNA replicate form สามารถคงอยู่ในรูป episome ในระยะเวลายาวนาน จึงเป็นกลไกหนึ่งที่ไวรัสใช้แฝงตัวอยู่ในร่างกายของสัตว์ติดเชื้อได้ [31]



รูปที่ 2.3 วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสก่อโรคโลหิตจางในไก่ (A) วงจรชีวิตของเชื้อไวรัสก่อโรคโลหิตจางในไก่ (B) กระบวนการทำให้เซลล์แตกเพื่อปล่อยไวรัสออกนอก [26]

2.5 การก่อโรค

สัตว์ที่ติดเชื้อไวรัส CAV มักได้รับผลเสียหายโดยตรงต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายสัตว์ทำให้เกิดความบกพร่องและมีการแสดงออกของอาการโรค เช่น อวัยวะภายในที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ต่อม้ำเหลืองเกิดการฝ่อ ตลอดจนเกิดภาวะโลหิตจางชนิดรุนแรง มีผลทำให้สัตว์มีอัตราการตายสูง นอกจากนี้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ เซลล์ hemocytoblast ที่อยู่ในไขกระดูกสันหลังซึ่งจะพัฒนาต่อไปเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์เม็ดเลือดต่างๆ และเซลล์ T lymphocyte precursor ที่อยู่ในต่อมไทมัสซึ่งจะพัฒนาต่อไปเป็น T cell ต่างเป็นเซลล์เป้าหมายและไวต่อการติดเชื้อไวรัส CAV ทำให้เชื้อไวรัสมีการเพิ่มจำนวนและทำลายเซลล์ดังกล่าวด้วยวิธีการ apoptosis [30] ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 เซลล์เป้าหมายสำหรับเพิ่มจำนวนเชื้อไวรัส CAV [30]

ผลจากการที่เซลล์ hemocytoblast และเซลล์ T lymphocyte precursor ถูกทำลาย มีดังนี้

2.5.1 ผลการทำลายเซลล์ hemocytoblast

จากการทดลองในไก่ที่มีอายุ 1 วัน ทำการติดเชื้อไวรัส CAV พบว่าสามารถพบเชื้อไวรัสในเซลล์ hemocytoblast ที่ไขกระดูกสันหลัง ภายในระยะ 3-4 วัน ภายหลังจากติดเชื้อ จากนั้นเซลล์ hemocytoblast จะถูกทำลายและลดจำนวนลง ภายในระยะ 8 วัน ภายหลังจากติดเชื้อ ซึ่งระยะนี้ จะทำให้ภาวะโลหิตจางเพิ่มความรุนแรงขึ้น และส่งผลให้พบจุดเลือดออกตามกล้ามเนื้อเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังส่งผลทำให้ค่า hematocrit ต่ำลง เนื่องจากจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดง ลดลง และภายหลังจากติดเชื้อ 16-18 วัน ไขกระดูกสันหลังจะถูกทำลายในที่สุด [30],[32],[33]

2.5.2 ผลการทำลายเซลล์ T lymphocyte precursor

จากการทดลองในไก่ที่มีอายุ 1 วัน ทำการติดเชื้อไวรัส CAV พบว่าต่อมไธมัสพบการถูกทำลายภายในระยะ 2 สัปดาห์หลังติดเชื้อ โดยพบปริมาณเซลล์ติดเชื้ออยู่ที่ต่อมไธมัสสูงสุดในวันที่ 6-7 หลังติดเชื้อ [32] ในทางตรงข้ามเมื่อไก่ที่มีอายุ 3 สัปดาห์ขึ้นไปติดเชื้อ พบว่าเซลล์ในต่อมไธมัสดังกล่าวยังคงมีความไวในการติดเชื้อไวรัส แต่พบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นที่ต่อมไธมัสเพียงเล็กน้อย [34] นอกจากนี้ยังคงพบเซลล์ T lymphocyte progenitor cell ติดเชื้อไวรัสถูกทำลายจึงส่งผลให้ T lymphocyte (T cell) มีจำนวนลดลงทำให้เกิดภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องจึงเพิ่มโอกาสการติดเชื้ออื่นๆได้ง่ายและส่งผลให้การตอบสนองต่อวัคซีนลดลง นอกจากนี้ยังส่งผลต่อระบบการทำงานของสาร cytokine อันเนื่องมาจาก effector ต่างๆ ถูกทำลายจึงทำให้การแสดงออกของโรครุนแรงขึ้นและมีผลทำให้ต่อมเบอรัชถูกทำลาย ตามลำดับ [30],[32]

อย่างไรก็ตามไม่พบการถูกทำลายของเซลล์ B lymphocyte precursor โดยเชื้อไวรัส CAV ดังนั้น B lymphocyte (B cell) จึงไม่ถูกทำลาย ร่างกายสัตว์ยังคงสามารถสร้างแอนติบอดีได้ปกติ [30] โดยพบว่าสัตว์ติดเชื้ออายุมากจะมีการสร้างภูมิคุ้มกันหรือแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสภายใน 4-7 วันหลังได้รับเชื้อ ในขณะที่สัตว์ติดเชื้อที่มีอายุ 1 วัน จะใช้ระยะเวลาในการสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสนานกว่าโดยพบการสร้างแอนติบอดีภายหลัง 2-3 สัปดาห์หลังได้รับเชื้อ [35]

2.6 การแพร่ระบาด ควบคุมและป้องกันโรค

เชื้อไวรัส CAV สามารถแพร่ระบาดในฝูงไก่ ได้ 2 ทาง คือ

2.6.1 Vertical transmission เป็นการแพร่กระจายเชื้อไวรัสจากแม่สู่ลูก โดยแม่ไก่ที่ติดเชื้อในระหว่างการฟักไข่จะสามารถส่งผ่านเชื้อไวรัสไปยังลูกไก่ได้

2.6.2 Horizontal transmission เป็นการแพร่กระจายเชื้อไวรัสผ่านทาง การกิน การหายใจ และการสัมผัส โดยสามารถพบเชื้อได้ในอุจจาระของสัตว์ติดเชื้อ ภายหลังจากระยะ 5 สัปดาห์ของการติดเชื้อ [36], [37]

ในการควบคุมและป้องกันโรคโลหิตจางในไก่ สามารถทำได้โดยการให้วัคซีน ซึ่งวัคซีนที่ใช้ในปัจจุบัน มี 2 ชนิด คือ

1. วัคซีนเชื้อเป็น (Live attenuated vaccine) ได้จากการนำตับของสัตว์ติดเชื้อผสมในน้ำดื่มให้สัตว์กิน มักให้ในสัตว์ที่มีอายุประมาณ 13-15 สัปดาห์ โดยเฉพาะการให้วัคซีนชนิดนี้ในแม่ไก่ ควรให้วัคซีนก่อนระยะการฟักไข่ 3-4 สัปดาห์ เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสไปยังลูกไก่ โดยทาง Vertical transmission อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวอาจก่อให้เกิดการติดเชื้อก่อโรคอื่นๆ แทรกซ้อนซึ่งปะปนมากับวัคซีนที่ใช้

2. วัคซีนเชื้อตาย (Killed vaccine) พบว่าการผลิตวัคซีนเชื้อตายยังมีข้อจำกัดในการผลิตให้ได้ปริมาณมากเพียงพอ

อย่างไรก็ตามการตรวจระดับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัส CAV ในสัตว์โดยเฉพาะในฝูงแม่พันธุ์ไก่ก่อนระยะฟักไข่ เพื่อชี้บ่งว่าแม่ไก่มีภูมิคุ้มกันซึ่งส่งผลต่อลูกไก่ทำให้ได้รับภูมิคุ้มกันจากแม่ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องกระทำควบคู่กับการให้วัคซีนเพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส CAV ได้อย่างมีประสิทธิภาพ [16], [19]

2.7 การตรวจวินิจฉัยโรค

การตรวจวินิจฉัยโรคในสัตว์ที่ติดเชื้อไวรัส CAV สามารถทำได้โดยการเพาะแยกเชื้อไวรัสการตรวจหาเชื้อไวรัสโดยตรง และการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสด้วยวิธีทางซีรัมวิทยา อย่างไรก็ตามเมื่อเชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกายสัตว์จะพบปริมาณเชื้อไวรัสที่แตกต่างกันตามระยะเวลาที่สัตว์ได้รับเชื้อซึ่งมีผลต่อการเลือกวิธีตรวจวินิจฉัยที่เหมาะสมโดยพบว่า ปริมาณเชื้อไวรัสพบมากสูงสุดในวันที่ 7 หลัง สัตว์ได้รับเชื้อ โดยสามารถพบสูงสุดที่อวัยวะต่าง ๆ นอกจากนี้อาจยังสามารถพบได้ที่อวัยวะอื่นๆ เช่น ม้าม ไช้กระดูกสันหลัง ต่อมเบอริชซ่า ปอด หัวใจ และกล้ามเนื้อ เป็นต้น รวมทั้งในอุจจาระและ buffy coat cell ดังนั้นการเพาะแยกเชื้อไวรัสหรือการตรวจหาเชื้อไวรัสโดยตรง จึงเป็นวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคที่เหมาะสม ในขณะที่ภายหลังจากสัตว์ได้รับเชื้อ 14 วัน ขึ้นไป ระดับ neutralizing antibody ในร่างกายสัตว์จะถูกสร้างและมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่ปริมาณเชื้อไวรัสจะลดต่ำลงแต่ยังคงสามารถพบเชื้อไวรัสได้บ้างใน ต่อมไธมัส, เซลล์เม็ดเลือดขาว และ buffy coat cell [38] ดังนั้นวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคทางซีรัมวิทยาจึงเหมาะสมกว่าการเพาะแยกเชื้อไวรัสหรือการตรวจหาเชื้อไวรัสโดยตรง

ในปัจจุบันวิธีการตรวจวินิจฉัยโรคเชื้อไวรัส CAV ในห้องปฏิบัติการที่นิยมใช้ มีดังนี้

2.7.1 วิธีการเพาะแยกเชื้อเชื้อไวรัส สามารถทำได้ 2 วิธี

2.7.1.1 การเพาะแยกเชื้อด้วยวิธี Bioassay

ทำการฉีดตัวอย่างที่สงสัยเข้าทางช่องท้องหรือกล้ามเนื้อของลูกไก่ SPF ที่มีอายุ 1 วันซึ่งไม่ได้รับภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสจากแม่ หลังจากนั้น 12 – 16 วัน แล้วตรวจดูรอยโรค เช่น ทำการวัดค่า hematocrit และ ตรวจดูความผิดปกติของรอยโรคด้วยวิธีจุลพยาธิวิทยา (histopathological finding) [4],[11]

2.7.1.2 การเพาะแยกเชื้อด้วยวิธี Cell culture

การเพาะแยกเชื้อด้วยวิธี cell culture นิยมเพาะเลี้ยงมากที่สุดโดยใช้เซลล์ MDCC-MSB1 (Marek's disease virus-associated lymphoblastoid cell line) ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ที่ได้จากเซลล์ lymphocyte (T cell) ของไก่ที่เปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์ T-cell splenic lymphoma ที่ติดเชื้อ Marek's แล้วดูการเปลี่ยนแปลงของพยาธิสภาพของเซลล์ (cytopathic effect) [32],[39] และยืนยันผลด้วยวิธีการ indirect immunofluorescent [40] แต่พบว่าเชื้อไวรัส CAV บางสายพันธุ์ไม่สามารถเจริญได้ในเซลล์ MDCC-MSBI อย่างไรก็ตามยังมีเซลล์ lymphoblastoid cell line อื่นๆที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสนี้ได้แก่ MDCC-CU 147 (Monoclonal lesion derived T-cell line), MDCC-JP2 (T cell, MDV transformed), LSCC-I104/ x5B1(B-cell, induced by ALV), LSCC-HD11 (AMV transformed) [41]

อย่างไรก็ตามการเพาะแยกเชื้อนั้นยังคงมีขั้นตอนที่ยุ่งยากและใช้เวลานาน นอกจากนี้ห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องมีความพร้อมทั้งเครื่องมือและบุคลากร จึงไม่เป็นที่นิยมนัก

2.7.2 การตรวจหาเชื้อไวรัสโดยตรง

2.7.2.1 การตรวจหาเชื้อไวรัสโดยตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

วิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสจากตัวอย่างติดเชื้อโดยตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนสามารถทำได้แต่ไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวต่ำ [2]

2.7.2.2 การตรวจหาเชื้อไวรัสโดยตรงโดยอาศัยเทคนิคทางอิมมูโนวิทยา

เป็นการตรวจหาเชื้อไวรัสโดยตรงโดยอาศัยความจำเพาะระหว่างเชื้อไวรัสซึ่งเป็นแอนติเจนกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัส ซึ่งทำได้หลายวิธี เช่น วิธี direct หรือ indirect immunofluorescence staining ซึ่งวิธีดังกล่าวสามารถทดสอบกับตัวอย่างอวัยวะต่างๆ รวมทั้งเซลล์เพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสโดยใช้พอลิโคลนัลแอนติบอดีหรือมอนอโคลนัลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CAV และใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วย FITC เป็นตัวติดตาม [40] แล้วอ่านผลภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ และ Dot blot hybridization [42] เป็นต้น

2.7.2.3 การตรวจหาเชื้อไวรัสโดยตรงโดยอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

วิธีการตรวจหาเชื้อไวรัสโดยตรงโดยอาศัยเทคนิคทางอณูชีววิทยาเป็นวิธีการตรวจหาสารพันธุกรรมของไวรัสโดยทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยอาศัยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนของไวรัสจึงเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะที่สูงและให้ผลที่รวดเร็วและแม่นยำ [38] ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction หรือ PCR), *In situ* hybridization [43], Loop mediated isothermal amplification หรือ LAMP [44] เป็นต้น ปัจจุบันวิธี PCR นั้นเป็นวิธีทางอณูชีววิทยาที่นิยมใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัส CAV ซึ่งวิธีนี้สามารถนำมาใช้ตรวจหาเชื้อไวรัสในตัวอย่างได้หลายชนิด เช่น ตัวอย่างอวัยวะของสัตว์ติดเชื้อ, เซลล์เพาะเลี้ยงติดเชื้อ รวมถึงตัวอย่างเนื้อเยื่อบนแผ่นสไลด์ที่ตรึงอยู่ในพาราฟิน (formalin-fixed paraffin-embedded tissues), blood smear รวมทั้งซีรัม เป็นต้น [45], [46] นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาวิธี nested PCR ให้สามารถตรวจหาเชื้อไวรัส CAV ที่มีความไวและความจำเพาะที่สูงกว่าวิธี PCR [47] รวมถึงการพัฒนาวิธี Real-time PCR ให้สามารถตรวจหาปริมาณของเชื้อไวรัสได้ [48], [49] อีกทั้งยังมีการพัฒนาวิธี multiplex PCR สำหรับตรวจหาเชื้อหลายชนิดพร้อมๆกันด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสแต่ละชนิดทำให้สามารถตรวจและขี้งเชื้อไวรัส CAV จากเชื้อไวรัสสัตว์ปีกชนิดอื่นๆ ได้แก่ Avian reovirus (ARV), Avian adenovirus group I (AAV-I), Infectious bursal disease virus (IBDV) ได้ในคราวเดียวกัน [50]

2.7.3 การตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสด้วยวิธีทางซีรัมวิทยา

การตรวจวินิจฉัยโรคเชื้อไวรัส CAV โดยตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสด้วยวิธีทางซีรัมวิทยามักใช้ตรวจเบื้องต้นสำหรับชี้บ่งว่าฝูงสัตว์มีการสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อไวรัสภายหลังการติดเชื้อหรือได้รับวัคซีน เพื่อประโยชน์ในการควบคุมและป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส แต่ไม่สามารถยืนยันได้ว่าสัตว์ติดเชื้อจริง โดยเฉพาะในช่วงแรกของการติดเชื้อซึ่งสัตว์อาจยังไม่มีการสร้างแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส จึงจำเป็นต้องตรวจยืนยันด้วยการเพาะแยกเชื้อหรือใช้วิธีตรวจหาเชื้อโดยตรงด้วยวิธีข้างต้นที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสด้วยวิธีทางซีรัมวิทยาในปัจจุบันสามารถทำได้หลายวิธี เช่น Virus neutralization (VN) test, Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) [51], Immunofluorescence (IF) test [52], Immunoperoxidase (IP) test [35] จากการศึกษาของ Otaki และคณะ (1991) ได้เปรียบเทียบวิธี Virus neutralization (VN) test กับวิธี Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) และ Immunofluorescence (IF) test พบว่าวิธี VN test ให้ความไวในการตรวจหาแอนติบอดีสูงกว่า ELISA และ IF test [53] อย่างไรก็ตามการตรวจเบื้องต้น (screening test) นิยมใช้วิธี ELISA test เนื่องจากเป็นวิธีที่ให้ผลรวดเร็วและสามารถตรวจตัวอย่างคราวละจำนวนมากได้ จึงมีการศึกษาพัฒนาวิธี ELISA โดยใช้แอนติเจนที่เป็นอนุภาคไวรัสซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงในเซลล์ MDCC-MSB1 [54] รวมทั้งการอาศัยความรู้ด้าน พันธุวิศวกรรมผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของเชื้อไวรัส CAV ขึ้นเพื่อใช้เป็นโปรตีนแอนติเจนจากสิ่งมีชีวิตทั้งในแบคทีเรีย *Escherichia coli* [55],[56],[57],[58] baculovirus [26] และในพืช [59]

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Pallister และคณะ (1994) ได้ทำการแสดงออกรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP1 ในแบคทีเรีย *E.coli* โดยอาศัยเวกเตอร์ pGEX3 สำหรับแสดงออกโปรตีน พบว่าโปรตีน VP1 ที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อ 2A9 CAV neutralizing monoclonal antibody และได้นำรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP1 มาทำให้บริสุทธิ์โดยอาศัย glutathione agarose bead พบว่าโปรตีน VP1 ที่ผลิตได้มีปริมาณน้อยและภายหลังการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์พบโปรตีนส่วนใหญ่ถูกย่อยได้โปรตีนชิ้นขนาดประมาณ 30 - 34 กิโลดาลตัน ซึ่งสันนิษฐานอาจเป็นผลจากการที่มีจำนวนกรดอะมิโนชนิดอาร์จินิน 24 กรดอะมิโน ในบริเวณปลายด้าน N-terminal ของโปรตีน VP1 เป็นผลทำให้บริเวณดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นประจุบวกสูงจึงสามารถจับกับดีเอ็นเอ และทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรียจึงต้องกำจัดส่วนของโปรตีนดังกล่าวออกเป็นผลทำให้เกิดการย่อยโปรตีนขึ้น จากการทดลองดังกล่าวจึงได้ตัดชิ้นส่วนของโปรตีน VP1 ที่บริเวณด้านปลาย N-terminal ออก จำนวน 67 กรดอะมิโน พบว่าปริมาณโปรตีน VP1 เพิ่มสูงขึ้นแต่ความสามารถในการละลายของโปรตีนลดลง เนื่องจากค่าเฉลี่ยของ

ประจู่ต่อเรซิดิวส์ลดลงจาก 0.078 เป็น 0.021 ส่งผลต่อการไม่ละลายของโปรตีน จึงทำให้ได้ปริมาณโปรตีนแอนติเจนน้อย ในการนำไปใช้พัฒนาเทคนิค ELISA เพื่อตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CAV จึงได้นำโปรตีน VP1 ทั้งโปรตีนซึ่งมีการถูกย่อยไปใช้พัฒนา ELISA และพบผลบวกผิดพลาดเกิดขึ้นเนื่องมาจากการเกิดปฏิกิริยาแบบไม่จำเพาะ [55]

ในปี ค.ศ. 1998 Noteborn และคณะ ได้ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน VP1 และ VP2 ใน baculovirus ซึ่งถูกเพิ่มจำนวนในเซลล์แมลง Sf9 พบว่าเมื่อนำ baculovirus ซึ่งสามารถแสดงออกโปรตีน VP1 และ VP2 ในเซลล์แมลง Sf9 ได้พร้อมกัน เมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect immunofluorescence พบว่าโปรตีน VP2 สามารถส่งเสริมให้โปรตีน VP1 เกิดปฏิกิริยากับ CAV-specific neutralizing MAb CVI-CAV-132.1 ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาที่พบในเซลล์แมลง Sf9 ที่มีการแสดงออกของโปรตีน VP1 หรือ VP2 เพียงอย่างเดียว แสดงถึงโปรตีน VP2 อาจเป็นโปรตีนที่ช่วยให้โปรตีน VP1 สามารถประกอบโครงสร้างแคพซิดของไวรัสที่มีอิทธิพลที่ถูกต้องและทำให้เกิด neutralizing epitope บนโปรตีน VP1 ได้ [26]

Soliman และคณะ (2006) ได้ทำการพัฒนาระบบ Batch fermentation และทดลองผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP1 ในแบคทีเรีย *E.coli* โดยอาศัยเวกเตอร์ pRSET สำหรับแสดงออกโปรตีนและชักนำด้วย 0.1 มิลลิโมลาร์ IPTG และใช้ระยะเวลา 5 ชั่วโมงซึ่งเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมซึ่งแบคทีเรียสามารถผลิตโปรตีน VP1 ที่มีคุณสมบัติละลายในปริมาณสูงสุดเท่ากับ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ภายหลังจากทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยวิธี dialysis และตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตจึงได้นำรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP1 เป็นโปรตีนแอนติเจนและนำไปพัฒนาวิธีตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CAV ด้วยวิธี indirect ELISA ซึ่งจากการทดสอบตัวอย่างซีรัมไก่ 100 ตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับชุดทดสอบสำเร็จรูป IDEXX ELISA test kit พบว่ามีความไวและความจำเพาะของวิธี indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้นเท่ากับ 93.3% และ 100% [56]

Lee และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน VP1 ในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 โดยอาศัยเวกเตอร์ pET28 สำหรับแสดงออกของโปรตีน จากการศึกษาพบว่าเมื่อทำการตัดชิ้นส่วนบริเวณปลายด้าน N-terminal ของโปรตีน VP1 ซึ่งทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เป็นจำนวน 30, 60 และ 129 กรดอะมิโน พบว่าระดับการแสดงออกของโปรตีน VP1 เมื่อชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพิ่มขึ้นตามลำดับ จึงได้นำโปรตีน VP1 ซึ่งถูกตัดกรดอะมิโนออก 129 (Nd129VP1) ซึ่งมีระดับการแสดงออกสูงสุดและมีคุณสมบัติไม่ละลายมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการทำลายโครงสร้างของโปรตีนเพื่อให้โปรตีนละลายด้วยยูเรีย ความเข้มข้น 8 โมลาร์ และ re-folding โปรตีน แล้วอาศัยวิธี immobilized metal ion chromatography ทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ พบว่าได้โปรตีน Nd129VP1 บริสุทธิ์ ในปริมาณเท่ากับ 26.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

นอกจากนี้เมื่อทดสอบคุณสมบัติความเป็นแอนติเจน (antigenicity) ของโปรตีน Nd129VP1 พบว่ายังสามารถเกิดปฏิกิริยากับซีรัมของไก่ติดเชื้อไวรัส CAV ได้ [58]

ในปี ค.ศ. 2011 Lee และคณะ ได้ทำการพัฒนาการแสดงออกของโปรตีน VP1 ในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)-pLysS โดยอาศัยเวกเตอร์ pGEX-4T-1 สำหรับแสดงออกของโปรตีนซึ่งมี GST tag สำหรับเชื่อมต่อน้ำยีน จากการปรับ codon usage ของโปรตีน VP1 บริเวณด้านปลาย N-terminal ซึ่งเป็นบริเวณที่มักพบกรดอะมิโนชนิดอาร์จินินและไลซีน จำนวน 132 กรดอะมิโน (Opt-VP1) แล้วทำการโคลนน้ำยีน Opt-VP1 เข้ากับเวกเตอร์ดังกล่าว ภายหลังการแสดงออกของโปรตีน Opt-VP1 ซึ่งชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบโปรตีน Opt-VP1 ในปริมาณ 17.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีความสามารถในการละลาย 80% ของโปรตีน Opt-VP1 ทั้งหมด จึงนำโปรตีน Opt-VP1 ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี affinity chromatography โปรตีน Opt-VP1 บริสุทธิ์ ได้ถูกนำไปพัฒนาวิธี indirect ELISA สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CAV พบว่าสามารถขจัดซีรัมติด/ไม่ติดเชื้อไวรัส CAV ได้ด้วยวิธี indirect ELISA [59]

ในปี ค.ศ. 2012 Lien และคณะ ได้ผลิตมอนอโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน Nd129VP1 โดยเมื่อนำ E3 mAb ที่ผลิตได้ไปทดสอบกับตัวอย่างตับและต่อมไธมัสติดเชื้อไวรัส CAV ด้วยวิธี immunohistochemistry และนำไปทดสอบกับ MSB-1 cells ซึ่งติดเชื้อไวรัส CAV พบว่า E3 mAb มีความจำเพาะกับอนุภาคของไวรัส CAV นอกจากนี้ยังนำ E3 mAb ไปพัฒนา immunoaffinity column และสามารถแยกอนุภาคไวรัส CAV จากตัวอย่างติดเชื้อได้ แสดงถึง E3 mAb มีคุณสมบัติในการเป็น neutralizing antibody [60]

Chansiripornchai และคณะ (2013) ได้พัฒนาวิธี indirect ELISA โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัส CAV ที่แยกได้จากประเทศไทยในเซลล์ MDCC-MSB1 cells แล้วแยกอนุภาคไวรัสด้วยวิธี ultracentrifugation อนุภาคไวรัส CAV ที่แยกได้ถูกนำไปใช้เป็นแอนติเจนสำหรับพัฒนาวิธี indirect ELISA โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบวิธี indirect ELISA พัฒนาขึ้นกับชุดทดสอบสำเร็จรูป IDEXX ELISA test kit พบว่ามีความไว ความจำเพาะและความถูกต้องของวิธี indirect ELISA เท่ากับ 93%, 78% และ 86% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบความสอดคล้องของผลการทดสอบระหว่างทั้งสองวิธีซึ่งแสดงค่า *Kappa* value เท่ากับ 0.71 [54]

บทที่ 3

วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง	จีโนมไทป์
<i>Escherichia coli</i> สายพันธุ์ DH5 α	F Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA \bar argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (r $_k^-$, m $_k^+$) phoA supE44 λ thi \bar 1 gyrA96 relA1
<i>Escherichia coli</i> สายพันธุ์ Roseta-gami	Δ (ara-leu)7697 Δ lacX74 Δ phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F[lac $^+$ lacI f pro] gor522::Tn10 trxB pRARE2 (Cam R , Str R , Tet R)

3.2 สัตว์ทดลองที่ใช้ในการทดลอง

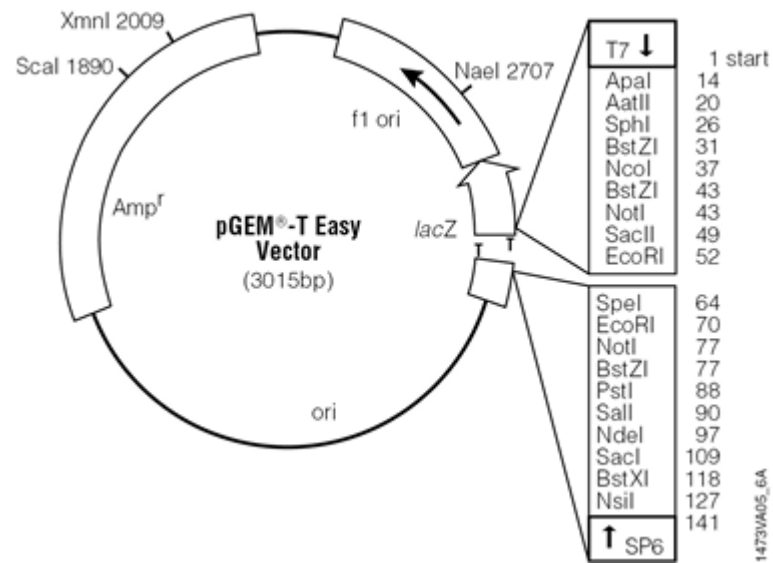
ตารางที่ 3.2 สัตว์ทดลองที่ใช้ในการทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการทดลอง	แหล่งที่มา
หนูสายพันธุ์ BALB/c (inbred strain) เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ จำนวน 2 ตัว สำหรับผลิต พอลิโคลนัลแอนติบอดี	ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

3.3 พลาสมิด

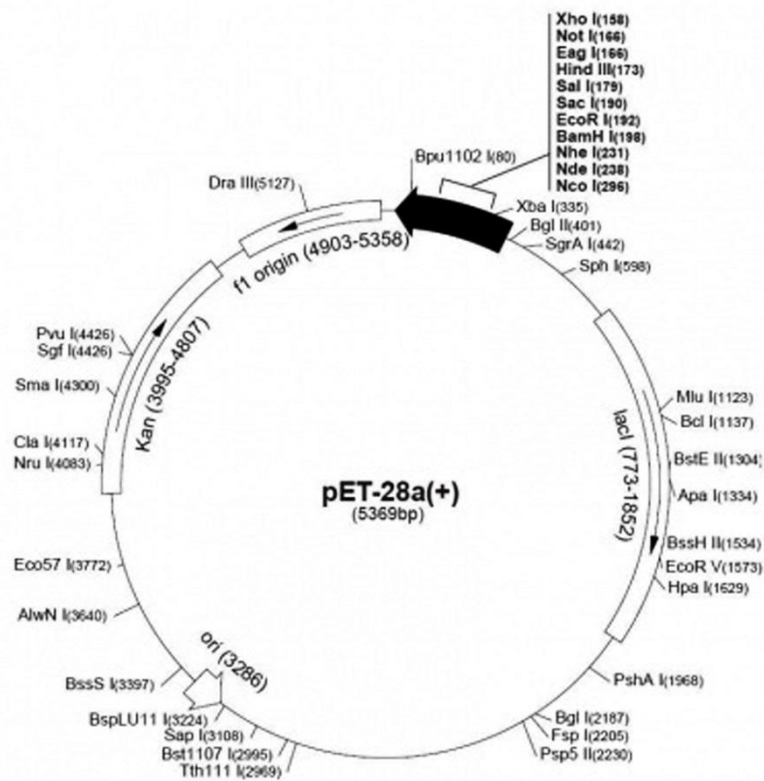
ตารางที่ 3.3 คุณลักษณะของพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

พลาสมิด	คุณลักษณะ	ยีนคัดเลือก
pGEM $^{\text{®}}$ -T Easy (รูปที่ 3.1)	ประกอบด้วย Lac promoter, Lac Z สำหรับการคัดเลือกด้วยวิธี blue – white selection, T overhang สำหรับเชื่อมต่อเข้ากับชิ้นยีน ผลผลิต PCR ที่มี A overhang โดยตรง	ยีน <i>Bla</i> สำหรับคัดเลือกด้วย ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (ampicillin)
pET28a (+) (รูปที่ 3.2)	ประกอบด้วย T7 promoter ควบคุมการถอดรหัสในแบคทีเรีย <i>E. coli</i> โดยอาศัย T7 RNA polymerase	ยีน <i>Kan</i> สำหรับคัดเลือกด้วย ยาปฏิชีวนะกานามัยซิน (kanamycin)



รูปที่ 3.1 พลาสมิด pGEM[®]-T Easy (Promega)

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
Multiple cloning regions	10-113
SP6 RNA polymerase promoter (-17 to +3)	124-143
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	126
pUC/M13 reverse sequencing primer binding site	161-177
<i>lacZ</i> start codon	165
<i>lac</i> operator	185-201
β -lactamase coding region	1322-2182
phage f1 region	2365-2820
<i>lac</i> operon sequences	2821-2981, 151-380
pUC/M13 forward sequencing primer binding site	2941-2957



รูปที่ 3.2 พลาสมิด pET-28a (+) (Novagen)

T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His Tag coding sequence	270-287
T7 Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (<i>BamH I</i> – <i>Xho I</i>)	158-203
T7 terminator	26-72
pBR322 origin	3286
<i>Kan</i> coding sequence	3995-4807

3.4 เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 3.4 เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการทดลอง

เอนไซม์ตัดจำเพาะ	บริเวณจดจำ (5'-3')	บัฟเฟอร์	อุณหภูมิในการบ่ม (° ซ)
<i>Eco</i> RI	G _A AATTC	<i>Eco</i> RI	37
<i>Nde</i> I	CA _A TATG	O	37
<i>Nhe</i> I	G _A CTAGC	Tango	37
<i>Xho</i> I	C _A TCGAG	R	37

O Buffer : 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl (pH 7.5), 10 มิลลิโมลาร์ MgCl₂, 100 มิลลิโมลาร์ NaCl และ 0.1 mg/ml BSA

R Buffer : 10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl (pH 8.5), 10 มิลลิโมลาร์ MgCl₂, 100 มิลลิโมลาร์ KCl และ 0.1 mg/ml BSA

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

Eco RI Buffer : 100 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl (pH 7.5), 10 มิลลิโมลาร์ MgCl₂, 50 มิลลิโมลาร์ NaCl และ 0.025% Triton[®] X-100

3.5 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 3.5 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

Primer	Sequence (5'-3')	Tm (° ซ)
Δ 60N_VP1_F ¹	GGGG <u>CATATG</u> CTGCCGAACCCCAATCTACTATGAC <i>Nde</i> I	71
VP1_R ^{1,6}	GGGG <u>CTCGAG</u> TCAGGGCTGCGACCCCA <i>Xho</i> I Stop	75
VP2_F ²	GGGG <u>CATATG</u> ATGCACGGGAACGGCGGACAACCGGC <i>Nde</i> I	76
VP2_R ^{2,4}	GGGG <u>CTCGAG</u> TCACACTATACGTACCGGGGCGGGGTTGT <i>Xho</i> I Stop	76
VP2_Front_F ³	GGGG <u>CATATG</u> GGGG <u>CCCGGGCTGGTCCGCGTGGCTCT</u> <i>Nde</i> I <i>Sma</i> I Thrombin ATGCACGGGAACGGCGGACAACCGGC	84
VP2_Front_R ³	GGGG <u>CTCGAG</u> <u>TCCACC</u> <u>GAATTC</u> ACCCACTATACGTACCGGGGCGGGGTTGT <i>Xho</i> I <i>Eco</i> RI	79
Full VP1 _Back_F ⁷ หรือ VP1_Syn_1F ⁸	GGGG <u>CATATG</u> GGG <u>GAATTC</u> GATTATGATATCCCGACCACG <i>Nde</i> I <i>Eco</i> RI <u>GAGAACCTGTACTTCCAAGGC</u> ATGGCAAGACGAGCTCGCAGACCGAGAGG TEV Protease	80
Δ 60N_VP1 _Back_F ⁶	GGGG <u>CATATG</u> GGG <u>GAATTC</u> GATTATGATATCCCGACCACG <i>Nde</i> I <i>Eco</i> RI <u>GAGAACCTGTACTTCCAAGGC</u> CTGCCGAACCCCAATCTACTATGAC TEV Protease	81
Δ 60N_VP1 _Front_F ⁵	GGGG <u>CATATG</u> <i>Nde</i> I GGG <u>CCCGGGCTGGTCCGCGTGGCTCT</u> CTGCCGAACCCCAATCTACTATGAC <i>Sma</i> I Thrombin	78
Δ 60N_VP1 _Front_R ⁵	GGGG <u>CTCGAG</u> <u>TCCACC</u> <u>GAATTC</u> ACCGGGCTGCGACCCCA <i>Xho</i> I <i>Eco</i> RI	75
VP2_Back_F ⁴	GGGG <u>CATATG</u> GGG <u>GAATTC</u> GATTATGATATCCCGACCACG <i>Nde</i> I <i>Eco</i> RI <u>GAGAACCTGTACTTCCAAGGC</u> ATGCACGGGAACGGCGGACAACCGGC TEV Protease	80
VP1_Syn_2F ⁸	AGAACCTGTACTTCCAAGGCATGGCAAGACGAGCTCGCAGACCGAGAGGCCGATTTTACG	60
VP1_Syn_3F ⁸	ACCGAGAGGCCGATTTTACGCCTTCAGAAGAGGACGGTGGCACAACCTCAAGCGACTTCG	60

ตารางที่ 3.5 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง (ต่อเนื่อง)

Primer	Sequence (5'-3')	Tm (° ซ)
VP1_Syn_4F ⁸	CACAACCTCAAGCGACTTCGACGAAGATATAAACTTCGACATCGGAGGAGACAGCGGTAT	60
VP1_Syn_5F ⁸	ATCGGAGGAGACAGCGGTATCGTAGACGAGCTTTTAGGAAGGCCTTTCACAACCCCCGCC	60
VP1_Syn_6R ⁸	GTAGATTGGGGGTTCCGGCAGCCTCACACTATACGTACCGGGGCGGGGTTGTGAAAGGCC	60
VP1_Syn_7R ⁸	TTCCGTGAGAAAGATGATTCCTTGAAGCGGATAGTCATAGTAGATTGGGGGTTCCGGCAG	60
VP1_Syn_8R ⁸	CATAGCCCCCGCTGTGCTGTTTTAGGCAGAATGAGTCCTTCCGTGAGAAAGATGATTC	60
VP1_Syn_9R ⁸	ACGGAGATCTTGGCGACTCTCGCCCCGTACAAGTGGTCTGCATAGCCCCCGCTGTGCTG	60
VP1_Syn_10R ⁸	GGGGAGGTTCAATGACGCTAGCAGGAAGTCTTTCAGGTTACGGAGATCTTGGCGACTCT <i>Nhe I</i>	60

¹ เป็นไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นยีน $\Delta 60N_VP1$

² เป็นไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นยีน VP2

³ เป็นไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นยีน VP2_Front

⁴ เป็นไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นยีน VP2_Back

⁵ เป็นไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นยีน $\Delta 60N_VP1_Front$

⁶ เป็นไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นยีน $\Delta 60N_VP1_Back$

⁷ เป็นไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นยีน Full length_VP1

⁸ เป็นไพรเมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนชิ้นยีน Syn_VP1

3.6 วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 3.6 วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

วัสดุและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	แหล่งที่มา
เอนไซม์ <i>Vent</i> DNA Polymerase	New England Biolabs
เอนไซม์ High fidelity PCR enzyme mix	Thermo scientific
เอนไซม์ <i>Taq</i> Polymerase	New England Biolabs
เอนไซม์ T_4 DNA ligase	New England Biolabs
ชุด Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit	Gene aid
ชุดสกัดพลาสมิด High-SPEED Plasmid Mini kit	Gene aid
1 kb DNA Ladder	Fermentas
Lambda/ <i>Hind</i> III	Fermentas
Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane	Bio-Rad
Prestained protein molecular weight marker	Fermentas
ENZhance lysis buffer	BIOTEC, NSTDA
Ni – NTA affinity chromatography	GE Healthcare Life Sciences
anti-His monoclonal antibody	R&D, Invitrogen
anti-VP1 และ anti-VP2 polyclonal antibody	Associate Professor Dr. Meng-Shiou Lee (China Medical University, Taiwan)
horseradish peroxidase-contugated goat anti-mouse IgG	Invitrogen
horseradish peroxidase-contugated goat anti-rabbit IgG	Cell signaling
horseradish peroxidase-rabbit anti-chicken/turkey IgG (H+L)	Invitrogen
ไมโครเพลท 96 หลุม สำหรับเคลือบแอนติเจน	Nunc
Freund's complete adjuvant (FCA)	Sigma
Freund's incomplete adjuvant (FIA)	Sigma

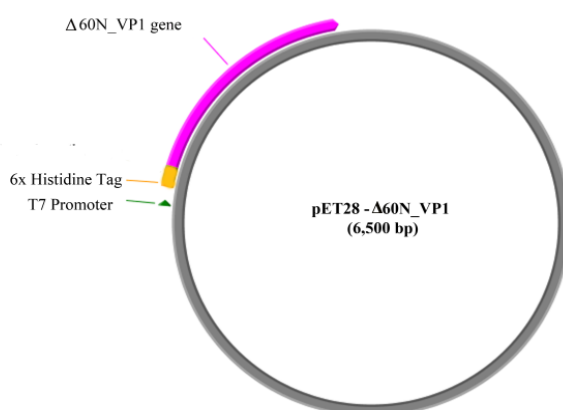
บทที่ 4

วิธีดำเนินการทดลอง

4.1 สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

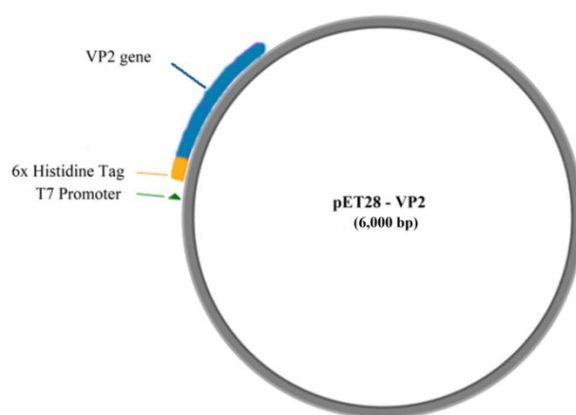
ทำการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดซึ่งใช้เวกเตอร์ pET28a ที่มียีนต้านยาปฏิชีวนะกามัยซิน เป็นยีนคัดเลือกซึ่งใช้เป็นเวกเตอร์ที่ชักนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยทำงานภายใต้โปรโมเตอร์ T7 โดยมี Histidine tag (His₆ Tag) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งแปลรหัสได้ลำดับกรดอะมิโนฮีสทีดีน จำนวน 6 กรดอะมิโนเรียงต่อกัน ซึ่ยีนที่ศึกษาจะถูกเชื่อมต่อกับ His₆ Tag ทางด้าน N-terminal โดยรูปแบบซึ่ยีนที่ศึกษาประกอบด้วยยีน VP1 ซึ่งได้แก่ Δ60N_VP1 และ full length VP1 และยีน VP2 นอกจากนี้ยังมียีนซึ่งได้จากการเชื่อมต่อกันระหว่างยีน Δ60N_VP1 กับยีน VP2 ต่างทิศทางกัน ได้แก่ VP2/ Δ60N_VP1 และ Δ60N_VP1/ VP2 ดังนั้นในการศึกษาวิจัยนี้จึงได้ออกแบบรีคอมบิแนนท์พลาสมิด จำนวน 5 รูปแบบ ซึ่งแตกต่างกันตามรูปแบบของซึ่ยีนที่ศึกษา ดังนี้

รูปแบบซึ่ยีนที่ 1: Δ60N_VP1 เป็นยีน VP1 ซึ่งตัดส่วนปลายด้าน N – terminal ที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนมีความยาวทั้งสิ้น 60 กรดอะมิโน และเป็นบริเวณที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดอาร์จินินจำนวนมากออก จึงมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP1 ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 181 ถึง 1,353 ซึ่งมีขนาด 1,173 คู่เบส โดยปลายด้าน 5' ของยีน จะมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Nde* I และปลายด้าน 3' ของยีน จะมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Xho* I เมื่อตัดต่อซึ่ยีนนี้เข้าสู่พลาสมิด pET28a ขนาด 5,300 คู่เบส ที่ตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสองนี้ จะได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28 - Δ60N_VP1 ซึ่งมีขนาดประมาณ 6,473 คู่เบส (ขนาดประมาณ 6,500 คู่เบส) (รูปที่ 4.1)



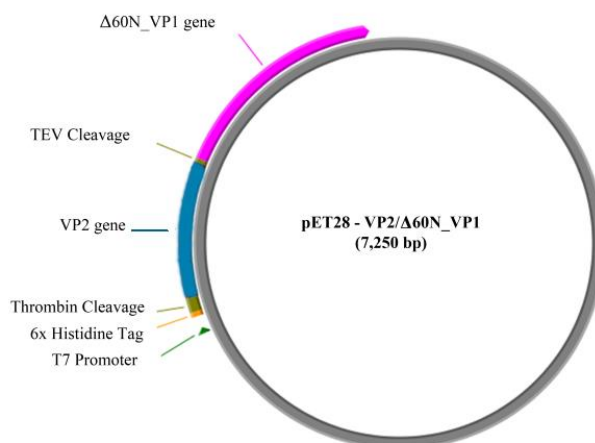
รูปที่ 4.1 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28 - Δ60N_VP1

รูปแบบชิ้นยีนที่ 2: VP2 เป็นยีน VP2 เต็มยีน (Full-length VP2) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ตั้งแต่ตำแหน่ง 1 ถึง 651 ซึ่งมีขนาด 651 คู่เบส โดยปลายด้าน 5' ของยีน จะมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Nde* I และปลายด้าน 3' ของยีน จะมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Xho* I เมื่อตัดต่อชิ้นยีนนี้เข้าสู่พลาสมิด pET28a ขนาด 5,300 คู่เบส ที่ตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสองนี้ จะได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28 - VP2 ซึ่งมีขนาด 5,951 คู่เบส (ขนาดประมาณ 6,000 คู่เบส) (รูปที่ 4.2)



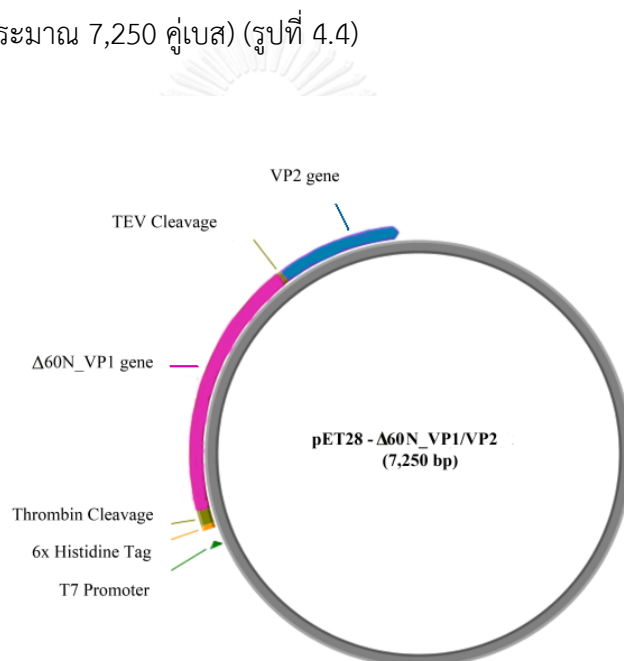
รูปที่ 4.2 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28 - VP2

รูปแบบชิ้นยีนที่ 3: VP2/ Δ 60N_VP1 เป็นยีน VP2 ซึ่งไม่มีรหัสหยุดการแปลรหัส (stop codon) (VP2_Front) ขนาด 648 คู่เบส โดยปลายด้าน 5' ของยีน VP2_Front จะมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Nde* I และมีบริเวณตัดจำเพาะของโปรตีน Thrombin (Thrombin cleavage) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งแปลรหัสได้ลำดับกรดอะมิโนที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน thrombin จำนวน 33 คู่เบส ส่วนปลายด้าน 3' ของยีน VP2_Front จะถูกเชื่อมต่อกับยีน Δ 60N_VP1 ที่ปลายด้าน 5' ด้วยตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Eco* RI ตามด้วยบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ TEV protease (TEV cleavage) เป็นบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งแปลรหัสได้ลำดับกรดอะมิโนที่มีความจำเพาะต่อเอนไซม์ TEV protease จำนวน 69 คู่เบส แล้วจึงตามด้วยยีน Δ 60N_VP1 (Δ 60N_VP1_Back) ซึ่งมีขนาด 1,173 คู่เบส ตามลำดับ โดยปลายด้าน 3' ของยีน Δ 60N_VP1_Back จะมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Xho* I เมื่อตัดต่อชิ้นยีนนี้เข้าสู่พลาสมิด pET28a ขนาด 5,300 คู่เบส ที่ตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Xho* I จะได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28 - VP2/ Δ 60N_VP1 ซึ่งมีขนาด 7,223 คู่เบส (ขนาดประมาณ 7,250 คู่เบส) (รูปที่ 4.3)



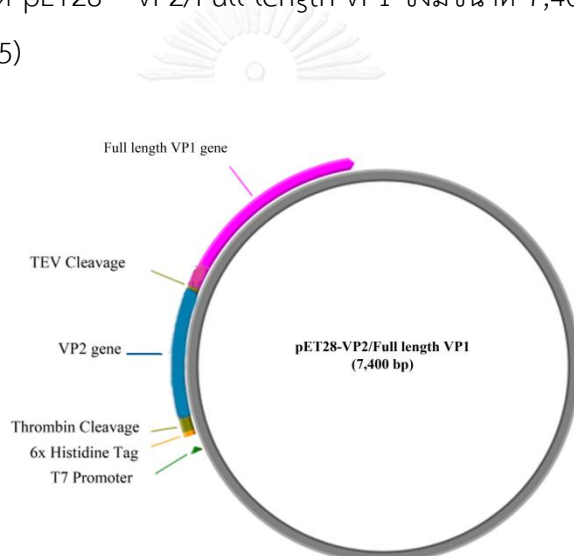
รูปที่ 4.3 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28 - VP2/ Δ 60N_VP1

รูปแบบชิ้นยีนที่ 4: $\Delta 60N_VP1/VP2$ เป็นยีน $\Delta 60N_VP1$ ซึ่งไม่มีรหัสหยุดการแปลรหัส (stop codon) ($\Delta 60N_VP1_Front$) ขนาด 1,170 คู่เบส โดยปลายด้าน 5' ของยีน $VP2_Front$ จะมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Nde* I และมีบริเวณตัดจำเพาะของโปรตีน Thrombin (Thrombin cleavage) จำนวน 33 คู่เบส ส่วนปลายด้าน 3' ของยีน $\Delta 60N_VP1_Front$ จะถูกเชื่อมต่อกับยีน $VP2$ ที่ปลายด้าน 5' ด้วยตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Eco* RI ตามด้วยบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ TEV protease (TEV cleavage) จำนวน 69 คู่เบส แล้วตามด้วยยีน $VP2$ ($VP2_Back$) ซึ่งมีขนาด 651 คู่เบส ตามลำดับ โดยปลายด้าน 5' ของยีน $VP2_Back$ จะมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Xho* I เมื่อตัดต่อชิ้นยีนนี้เข้าสู่พลาสมิด pET28a ขนาด 5,300 คู่เบส ที่ตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Xho* I จะได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28 - $\Delta 60N_VP1/VP2$ ซึ่งมีขนาด 7,223 คู่เบส (ขนาดประมาณ 7,250 คู่เบส) (รูปที่ 4.4)



รูปที่ 4.4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28 - $\Delta 60N_VP1/VP2$

รูปแบบชั้นยีนที่ 5: VP2/Full length VP1 เป็นยีน VP2 ซึ่งไม่มีรหัสหยุดการแปลรหัส (stop codon) (VP2_Front) ขนาด 648 คู่เบส โดยปลายด้าน 5' ของยีน VP2_Front จะมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Nde* I และมีบริเวณตัดจำเพาะของโปรตีน Thrombin (Thrombin cleavage) จำนวน 33 คู่เบส ส่วนปลายด้าน 3' ของยีน VP2_Front จะถูกเชื่อมต่อกับยีน VP1 เต็มยีน (Full length VP1) ด้วยตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Eco* RI ตามด้วยบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ TEV protease (TEV cleavage) เป็นบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งแปลรหัสได้ลำดับกรดอะมิโนที่มีความจำเพาะต่อเอนไซม์ TEV protease จำนวน 69 คู่เบส แล้วตามด้วยยีน Full length VP1 ซึ่งมีขนาด 1,353 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อตัดต่อชั้นยีนนี้เข้าสู่พลาสมิดเข้าสู่พลาสมิด pET28a ขนาด 5,300 คู่เบส ที่ตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Xho* I จะได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28 – VP2/Full length VP1 ซึ่งมีขนาด 7,403 คู่เบส (ขนาดประมาณ 7,400 คู่เบส) (รูปที่ 4.5)



รูปที่ 4.5 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28 – VP2/Full length VP1

จากการออกแบบดังกล่าวทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้ง 5 รูปแบบนี้ สามารถตรวจติดตามโปรตีนได้และสามารถทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี Affinity chromatography ได้โดยอาศัย Histidine tag ซึ่งอยู่ปลายด้าน N – terminal ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน นอกจากนี้รีคอมบิแนนท์โปรตีนในรูปแบบที่ 3, 4 และ 5 ยังสามารถถูกแยกออกจาก His₆ Tag โดยอาศัยการทำงานของโปรตีน Thrombin เข้าจับบริเวณ Thrombin cleavage และโปรตีนทั้งสองที่เชื่อมต่อกันสามารถถูกแยกออกจากกันโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ TEV protease เข้าจับบริเวณ TEV cleavage ที่อยู่ระหว่างโปรตีนสองโปรตีนได้

4.2 โคลนยีนที่เกี่ยวข้อง

4.2.1 ออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GeneBank

นำดีเอ็นเอของไวรัสที่สกัดจากตัวอย่างอวัยวะม้ามของโกดัดเชื้อไวรัส CAV (ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มงานไวรัสวิทยา ศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคตะวันออก) ที่ถูกเพิ่มจำนวนขึ้นยีนครอบคลุมบริเวณยีน VP1 และ VP2 จำนวน 454 คู่เบส ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัส CAV ตามวิธีการของ Farhoodi และคณะ, 2007 แล้วโคลนชิ้นส่วนยีนดังกล่าวเข้าสู่เวกเตอร์ pGEM-T จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้มาแปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน แล้วจึงนำข้อมูลทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนเปรียบเทียบกับข้อมูลจีโนมของเชื้อไวรัส CAV ที่แยกได้จากประเทศต่างๆ ที่อยู่ในฐานข้อมูล GeneBank โดยคัดเลือกจีโนมของไวรัสที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับของเชื้อไวรัสที่ตรวจพบมากที่สุด มาใช้ในเป็นต้นแบบในการออกแบบไพรเมอร์โดยไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบในงานวิจัยนี้ ดังแสดงในตารางที่ 3.5

4.2.2 เพิ่มจำนวนขึ้นยีนโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

นำดีเอ็นเอที่สกัดมาจากตัวอย่างอวัยวะม้ามของโกดัดเชื้อไวรัส CAV จากข้อ 4.2.1 ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสสำหรับเพิ่มจำนวนขึ้นยีนทั้งหมดที่ใช้ในงานวิจัย จำนวน 7 ยีน ได้แก่ ยีน VP2, ยีน VP2_Front, ยีน VP2_Back, ยีน $\Delta 60N_VP1$, ยีน $\Delta 60N_VP1_Front$, ยีน $\Delta 60N_VP1_Back$ และยีน Full length_VP1

4.2.2.1 เพิ่มจำนวนชิ้นยีน VP2, ยีน VP2_Front และยีน VP2_Back

ทำการผสมส่วนประกอบต่างๆ ในปฏิกิริยา ดังนี้ 1x Thermal polymerase buffer [20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl, 2 มิลลิโมลาร์ MgSO₄, 0.1% (v/v) Triton X-100, pH 8.8], 0.2 มิลลิโมลาร์ dNTP, 0.4 ไมโครโมลาร์ forward primer และ reverse primer (ตารางที่ 3.5), 1 unit เอนไซม์ Vent DNA Polymerase (New England Biolabs) และดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติโดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิตาม ตารางที่ 4.1 จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาไปตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ตารางที่ 4.1 โปรแกรมอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน VP2, ยีน VP2_Front และ ยีน VP2_Back

ขั้น	อุณหภูมิ (° ซ)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initial-denaturation	94	0.40	-
Denaturation	94	1	34
Annealing	63	1	
Extension	72	1	
Final extension	72	5	-

4.2.2.2 เพิ่มจำนวนชิ้นยีน $\Delta 60N_VP1$, ยีน $\Delta 60N_VP1_Front$ และยีน $\Delta 60N_VP1_Back$

ทำการผสมส่วนประกอบต่างๆ ในปฏิกิริยา ดังนี้ 1x High fidelity PCR buffer, 1.5 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$, 0.2 มิลลิโมลาร์ dNTP, 0.4 ไมโครโมลาร์ forward primer และ reverse primer (ตารางที่ 3.5), 1 unit เอนไซม์ High fidelity PCR enzyme mix (Thermo scientific) และดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติโดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิตามตารางที่ 4.2 จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาไปตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

ตารางที่ 4.2 โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาอุณหภูมิพอลิเมอเรสของยีน $\Delta 60N_VP1$, $\Delta 60N_VP1_Front$ และ $\Delta 60N_VP1_Back$

ขั้น	อุณหภูมิ (° ซ)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initial-denaturation	94	0.40	-
Denaturation	94	1	34
Annealing	57	1	
Extension	72	2	
Final extension	72	8	-

4.2.2.3 เพิ่มจำนวนชิ้นยีน Full length VP1

ทำการผสมส่วนประกอบต่างๆ ในปฏิกิริยา ดังนี้ 1x High fidelity PCR buffer, 1.5 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$, 0.2 มิลลิโมลาร์ dNTP, 0.4 ไมโครโมลาร์ forward primer และ reverse primer (ตารางที่ 3.5), 1 unit เอนไซม์ High fidelity PCR enzyme mix (Thermo scientific) และดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติโดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิตามตารางที่ 4.3 จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาไปตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

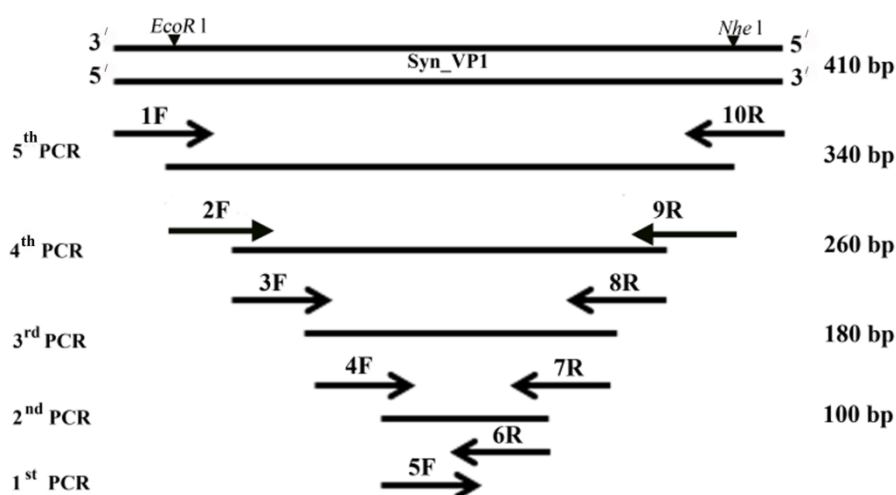
ตารางที่ 4.3 โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาอุณหภูมิพอลิเมอไรเซชันของยีน Full length VP1

ขั้น	อุณหภูมิ (° ซ)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initial-denaturation	94	0.40	-
Denaturation	94	1	34
Annealing	57	1	
Extension	72	4	
Final extension	72	8	-

4.2.2.4 เพิ่มจำนวนชิ้นยีน Syn_VP1

ยีน Syn_VP1 เป็นยีน VP1 เพียงบางส่วน (Syn_VP1) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ตำแหน่ง 1 ถึง 410 ซึ่งมีขนาด 410 คู่เบส เป็นบริเวณที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดอาร์จินิน จำนวนมากออก โดยปลายด้าน 5' ของยีน Syn_VP1 จะมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Nde* I และปลายด้าน 3' จะมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Nhe* I ทำให้สามารถถูกตัดและเชื่อมต่อยีน Syn_VP1 เข้ากับยีน Δ 60N_VP1 ที่อยู่ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28 - VP2/ Δ 60N_VP1 ซึ่งสร้างจากชิ้นยีนรูปแบบที่ 3 ได้เป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28 - VP2/Full length VP1

การสร้างชิ้นยีน Syn_VP1 จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง นอกเหนือจากการเพิ่มจำนวนชิ้นยีน Full length VP1 ในขั้นตอนที่ 4.2.2.3 เพื่อสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28 - VP2/Full length VP1 โดยทำการเพิ่มชิ้นยีน Syn_VP1 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบซ้อนทับ (Overlapping PCR) ดังแสดงในรูปที่ 4.6 ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้



รูปที่ 4.6 การเพิ่มจำนวนชิ้นยีน Syn_VP1 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบซ้อนทับ (Overlapping PCR)

4.2.2.3.1 ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ครั้งที่ 1

ทำการผสมส่วนประกอบต่างๆ ในปฏิกริยา ดังนี้ 1x Thermal polymerase buffer [20 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl, 2 มิลลิโมลาร์ MgSO₄, 0.1% (v/v) Triton X-100, pH 8.8], 0.2 มิลลิโมลาร์ dNTP, 0.1 ไมโครโมลาร์ 5F forward primer และ 6R reverse primer (รูปที่ 4.6), 0.5 unit เอนไซม์ *Vent* DNA Polymerase (New England Biolabs) โดยไม่ต้องอาศัย ดีเอ็นเอต้นแบบ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติโดยตั้งโปรแกรม อุณหภูมิตามตารางที่ 4.4 จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกริยาไปตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยวิธี อีเกอโรสเจลอิลีกโทรโฟเรซิส

ตารางที่ 4.4 โปรแกรมในการทำปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน Syn_VP1

ขั้น	อุณหภูมิ (° ซ)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initial-denaturation	94	0.40	-
Denaturation	94	0.45	25
Annealing	63	0.45	
Extension	72	0.50	
Final extension	72	10	-

4.2.2.3.2 ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ครั้งที่ 2 – 5

ทำการผสมส่วนประกอบต่างๆ ในปฏิกริยา ตามวิธีการข้อ 4.2.2.4.1 โดยใช้ไพรเมอร์ที่แตกต่างกันในแต่ละครั้งของทำปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ดังนี้คือ 4F forward primer และ 7R reverse primer เป็นไพรเมอร์สำหรับปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ครั้งที่ 2, 3F forward primer และ 8R reverse primer เป็นไพรเมอร์สำหรับปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ครั้งที่ 3, 2F forward primer และ 9R reverse primer เป็นไพรเมอร์สำหรับปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ครั้งที่ 4 และปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ครั้งที่ 5 ใช้ 1F forward primer และ 10R reverse primer ตามลำดับ และใช้ผลผลิต PCR ที่ได้จากปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสก่อนหน้า ซึ่งเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1:100 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแต่ละครั้งและเพิ่มปริมาณโดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติซึ่งตั้งโปรแกรมอุณหภูมิตามตารางที่ 4.5 จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกริยาแต่ละครั้งไปตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยวิธีอีเกอโรสเจลอิลีกโทรโฟเรซิส

4.2.3 ตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

เตรียม 1% อะกาโรสเจล โดยชั่งผงอะกาโรส จำนวน 1 กรัม จากนั้นละลายด้วย 1XTAE buffer (ภาคผนวก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยอาศัยความร้อนจนกระทั่งสารละลายเจลใส แล้วจึงเทลงบนถาดสำหรับขึ้นรูปเจล จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเจลแข็งตัว นำถาดเจลวางบนเครื่องอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยแช่อยู่ใน 1XTAE buffer ทำการผสมตัวอย่างดีเอ็นเอกับ 6x loading buffer (ภาคผนวก) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1x และใช้ GeneRule™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) และ Lamda/Hind III (Fermentas) เป็น DNA marker สำหรับเทียบขนาดและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ดูดสารผสมตัวอย่างและ DNA marker ใส่ลงในหลุมบนเจล จากนั้นให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการย้อมเจลด้วยสารละลายเอซีดีเอ็มโบร์โมด์ ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเจลไปล้างโดยแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำไปส่องภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล

4.2.4 สกัดดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลโดยใช้ชุด Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit

ตัดชิ้นส่วนอะกาโรสเจลที่มีดีเอ็นเอใส่ลงในหลอดไมโครพิพจ (น้ำหนักไม่เกิน 300 มิลลิกรัม) จากนั้นละลายอะกาโรสเจลด้วยบัฟเฟอร์ DF ปริมาตร 500 ไมโครลิตร โดยนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 60° ซ เป็นเวลา 20 นาที และกลับหลอดไปมาทุกๆ 1 – 2 นาที ดูดสารละลายเจลลงใน DF column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้งและทำซ้ำจนหมด จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ W1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้งและเติมบัฟเฟอร์ Wash (ที่เติมเอทานอลแล้ว) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้งและปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อล้างคอลัมน์ แล้วจึงย้ายคอลัมน์ใสในหลอดไมโครพิพจใหม่ จากนั้นดูต้นน้ำกลั่นปลอดเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ 55-60° ซ ใส่ลงตรงกลางคอลัมน์ ปริมาตร 20 – 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาที แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อชะดีเอ็นเอออกมา แล้วนำไปวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากการเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอกับ Lamda/Hind III ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

4.2.5 เชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับเวกเตอร์สำหรับเก็บข้อมูลทางพันธุกรรม (pGEM-T[®] easy vector)

4.2.5.1 เติมนิวคลีโอไทด์ Adenine (A)

เติม dATP ที่บริเวณปลาย 3'OH ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์/ดีเอ็นเอ โดยผสมส่วนประกอบต่างๆ ในปฏิกิริยา ดังนี้ 1x *Taq* buffer with (NH₄)₂SO₄ [750 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl, 200 มิลลิโมลาร์ (NH₄)₂SO₄, 0.1% (v/v) Tween 20, pH 8.8], 2.5 มิลลิโมลาร์ MgCl₂, 0.1 มิลลิโมลาร์ dATP, 1 unit เอนไซม์ *Taq* Polymerase (Fermentas) และชิ้นดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ (ข้อ 4.2.4) ในปริมาณที่เหมาะสม ปริมาตร 1-6 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70° ซ เป็นเวลา 15-30 นาที

4.2.5.2 เชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับเวกเตอร์

ทำการผสมส่วนประกอบต่างๆ ในปฏิกิริยา ดังนี้ 1x T₄ DNA ligase buffer (50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl, 10 มิลลิโมลาร์ MgCl₂, 1 มิลลิโมลาร์ ATP, 10 มิลลิโมลาร์ DTT, 25 µg/ml BSA), 1 unit เอนไซม์ T₄ DNA ligase (New England Biolabs) และสารละลายผสมระหว่างเวกเตอร์ pGEM-T[®] easy กับชิ้นส่วน DNA ที่เติม A แล้ว (ข้อ 4.2.5.1) ในอัตราส่วนที่เหมาะสม ปริมาตร 1- 3 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16° ซ เป็นเวลา 12 – 16 ชั่วโมง

4.2.6 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์

นำสารละลายผสม (ข้อ 4.2.5.2) เคลื่อนย้ายเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธี heat shock โดยเติมสารละลายผสม (ข้อ 4.2.5.2) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในคอมพีเทนต์เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการ heat shock ด้วยการนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42° ซ เป็นเวลา 90 วินาที แล้วรีบแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (ภาคผนวก) ปริมาตร 850 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วแบ่งสารละลายเชื้อในหลอดไมโครพิวจีใหม่ จำนวน 2 หลอด ดังนี้คือ 200 และ 800 ไมโครลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 1 นาที แล้วดูดอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง ปริมาตร 100 และ 700 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมตะกอนเชื้อให้เข้ากันแล้วนำสารละลายเชื้อ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิซิลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก) ซึ่งได้ spread ด้วย X-Gal ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และ IPTG ความ

เข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไว้แล้ว แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 14 – 16 ชั่วโมง เพื่อคัดเลือกโคโลนีสีขาวไปตรวจสอบทรานสเฟอร์แมนท์ที่มีชิ้นส่วนของยีนต่อไป

4.2.7 คัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนด้วยวิธี rapid size screening

เชื้อโคโลนีสีขาวบนอาหารแข็ง (ข้อ 4.2.6) ลงบนอาหารแข็งที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 14 – 16 ชั่วโมง เพื่อเตรียม master plate จากนั้นเชื้อโคโลนีสีขาวบน master plate จุ่มลงในสารละลาย pre-warmed lysis buffer (100 มิลลิโมลาร์ NaOH, 60 มิลลิโมลาร์ KCl, 5 มิลลิโมลาร์ EDTA, 10% (w/v) sucrose, 0.25% (w/v) SDS และ 0.05% (w/v) bromophenol blue) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ขยี้โคโลนีเพื่อให้เซลล์แตกที่เรียแตกออก จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 55° ซ เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใส ปริมาตร 15 ไมโครลิตร เพื่อนำไปตรวจสอบขนาดพลาสมิดดีเอ็นเอของทรานสเฟอร์แมนท์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้ 0.8 % อะกาโรสเจล และทำการรันอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เวลา 30 นาที

4.2.8 สกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด High-SPEED Plasmid Mini kit

เลือกโคโลนีทรานสเฟอร์แมนท์ที่มีชิ้นส่วนของยีน (ข้อ 4.2.7) โดยเชื้อโคโลนีที่เลือกบนอาหารแข็งใส่ในอาหารเหลว LB ที่มียาแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 – 16 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์ใส่ในหลอดไมโครพิวเจอร์ใหม่ ครั้งละ 1.5 มิลลิลิตร ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำจนเก็บเซลล์หมด แล้วทำการละลายตะกอนเซลล์ด้วย PD1 buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติม PD2 buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ ด้วยการกลับหลอดไปมา แล้วเติม PD3 buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วดูดส่วนใสใส่ลงใน PD column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสด้านล่างทิ้งและทำซ้ำจนหมด จากนั้นจึงเติม W1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสด้านล่างทิ้ง แล้วจึงล้าง column ด้วยการเติม wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสด้านล่างทิ้งอีกครั้ง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งแล้วจึงย้ายคอลัมน์ใสในหลอดไมโครพิวเจอร์ใหม่ ทำการชะดีเอ็นเอออกจาก column ด้วยการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ 55-60° ซ ปริมาตร 20 – 50 ไมโครลิตร ใส่ลงตรงกลางคอลัมน์ โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1

นาที แล้วนำไปวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากการเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอกับ Lamda/Hind III ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

4.2.9 ตรวจสอบชิ้นยีนในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยวิธีการย่อยโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้ (ข้อ 4.2.8) ปริมาณ 100 – 200 นาโนกรัม เติมลงในในปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วย 1x Eco RI buffer และเอนไซม์ตัดจำเพาะ Eco RI จำนวน 1 unit (ตารางที่ 3.4) จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 14 – 16 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปตรวจสอบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอภายหลังถูกตัดด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสตามวิธีการข้อ 4.2.3

4.2.10 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้และตรวจสอบว่ามีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Automated DNA sequencer (1st Base, Malaysia) และวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม Bioedit, Clustral X และ Vector NTI

4.3 สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดสำหรับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน

4.3.1 สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28-VP2 และ pET28-Δ60N_VP1

4.3.1.1 ตัดชิ้นส่วนยีน VP2 และยีน Δ60N_VP1 และเวกเตอร์ pET28a

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP2 (pGEM T – VP2) และ Δ60N_VP1(pGEM T – Δ60N_VP1) ที่ถูกต้อง (ข้อ 4.2.10) และเวกเตอร์ pET28a มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ได้แก่ Nde I และ Xho I (ตารางที่ 3.4) ดังนี้คือ

ตัดครั้งที่ 1 แบ่งเป็น 2 ส่วนดังนี้คือ ส่วนที่ 1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Nde I โดยเติมพลาสมิดดีเอ็นเอผสมในปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วย Buffer O และเอนไซม์ตัดจำเพาะ Nde I จำนวน 1 unit จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65° ซ เป็นเวลา 14 – 16 ชั่วโมง ส่วนที่ 2 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Xho I โดยเติมพลาสมิดดีเอ็นเอผสมในปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วย 1x buffer (สีแดง) และเอนไซม์ตัดจำเพาะ Xho I จำนวน 1 unit จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 14 – 16 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปตรวจสอบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอว่าถูกตัดสมบูรณ์หรือไม่ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วจึงนำไปตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล โดยนำสารผสมที่ได้จากปฏิกิริยาข้อ 4.3.1.1 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 180 ไมโครลิตร แล้วจึง

เติม 3 โมลาร์ sodium acetate (pH 5.2) ปริมาตร 20 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงเติม 100 % เอทานอลที่เย็น ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันเบาๆ โดยกลับหลอดไปมา แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ -20°C ซ้ำมคืน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C ซ เป็นเวลา 15 นาที สังเกตจะปรากฏตะกอนสีขาวของดีเอ็นเอแล้วดูดส่วนใสทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 75% เอทานอล ปริมาตร 750 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้วดูดส่วนใสทิ้งอีกครั้ง จากนั้นจึงละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ $55-60^{\circ}\text{C}$ ซ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอกับ *Lamda/Hind III*

ตัดครั้งที่ 2 นำ DNA ที่ตกตะกอนได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde I* และ *Xho I* แบบ โดยส่วนที่ 1 ซึ่งถูกตัดด้วย *Nde I* แล้วจะถูกนำมาตัดด้วย *Xho I* ในขณะที่ส่วนที่ 2 ซึ่งถูกตัดด้วย *Xho I* แล้วจะถูกนำมาตัดด้วย *Nde I* ผสมในปฏิกิริยาตามวิธีการข้างต้น จากนั้นนำไปตรวจสอบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแล้วทำการสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอตามขนาดที่ต้องการจากอะกาโรสเจลโดยใช้ชุด Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit ตามวิธีการข้อ 4.2.3 แล้วนำไปวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากการเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอกับ *Lamda/Hind III* ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

4.3.1.2 โคลนชิ้นส่วนยีน VP2 และยีน $\Delta 60N_VP1$ เข้าสู่เวกเตอร์ pET28a

นำชิ้นส่วนยีน VP2, ยีน $\Delta 60N_VP1$ และเวกเตอร์ pET28a ซึ่งปลายทั้งสองข้างถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde I* และ *Xho I* (ข้อ 4.3.1.1) มาเชื่อมต่อกันตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 4.2.5.2 จากนั้นเคลื่อนย้ายสารผสมเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ *E.coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat shock ตามวิธีการข้อ 4.2.6 นำตะกอนของเชื้อจะถูกนำไปเกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37°C ซ เป็นเวลา 14 – 16 ชั่วโมง เช่นเดียวกัน นำโคโลนีที่เกิดขึ้นไปตรวจสอบทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีชิ้นส่วนของยีนด้วยวิธี rapid size screening แล้วทำการคัดเลือกโคโลนีทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีชิ้นส่วนของยีน (ข้อ 4.2.7) โดยเชื้อโคโลนีที่เลือกบนอาหารแข็งใส่ในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณรีคอมบิแนนท์โคลนและสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด High-SPEED Plasmid Mini kit ตามลำดับ ตามวิธีการข้อ 4.2.8 และตรวจสอบชิ้นยีนในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยวิธีการย่อยโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde I* และ *Xho I* จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตามวิธีการข้อ 4.2.10

4.3.2 สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET 28-VP2/ Δ 60N_VP1 และ pET 28 - Δ 60N_VP1/VP2

4.3.2.1 ตัดชิ้นส่วนยีน VP2_Front และ VP2_Back และเวกเตอร์ pET28a

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP2_Front และ VP2_Back ที่ถูกต้อง (ข้อ 4.2.10) และเวกเตอร์ pET28a มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ได้แก่ *Nde* I และ *Eco* RI (ตารางที่ 3.4) ดังนี้คือ

ตัดครั้งที่ 1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I โดยเติมพลาสมิดดีเอ็นเอผสมในปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วย 1x Buffer O และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I จำนวน 1 unit จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65° ซ เป็นเวลา 14 – 16 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปตรวจสอบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอว่าถูกตัดสมบูรณ์หรือไม่ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วจึงนำไปตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลตามวิธีการข้อ 4.3.1.1

ตัดครั้งที่ 2 นำดีเอ็นเอที่ตกตะกอนได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI ตามวิธีการข้อ 4.2.10 จากนั้นนำไปตรวจสอบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วทำการสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอตามขนาดของชิ้นยีนที่ต้องการจากอะกาโรสเจลโดยใช้ชุด Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit ตามวิธีการข้อ 4.2.4

4.3.2.2 โคลนชิ้นส่วนยีน VP2_Front และยีน VP2_Back เข้าสู่เวกเตอร์ pET28a

นำชิ้นส่วนยีน VP2_Front, ยีน VP2_Back และเวกเตอร์ pET 28a ซึ่งปลายทั้งสองข้างถูกตัดด้วย *Nde* I และ *Eco* RI (ข้อ 4.3.2.1) มาเชื่อมต่อกัน ตามวิธีการข้อ 4.2.5.2 จากนั้นเคลื่อนย้ายสารผสมจากปฏิกิริยาเข้าสู่รีคอมบิแทนต์เซลล์ *E.coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat shock ตามวิธีการข้อ 4.2.6 และนำโคโลนีที่เกิดขึ้นไปตรวจสอบทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีชิ้นส่วนของยีนตามวิธีการข้อ 4.2.7 เลือกโคโลนีทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีชิ้นส่วนของยีนมาเพิ่มจำนวนและทำการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด High-SPEED Plasmid Mini kit ตามลำดับตามวิธีการข้อ 4.2.8 จากนั้นตรวจสอบชิ้นยีนในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยวิธีการย่อยโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Eco* RI แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตามวิธีการข้อ 4.2.10

4.3.2.3 ตัดชิ้นส่วนยีน $\Delta 60N_VP1_Back$, ยีน $\Delta 60N_VP1_Front$ กับเวกเตอร์ pET28-VP2_Front และเวกเตอร์ pET28-VP2_Back

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน $\Delta 60N_VP1_Back$ และ $\Delta 60N_VP1_Front$ ที่ถูกต้อง (ข้อ 4.2.10) กับเวกเตอร์ pET28-VP2_Front และ pET28-VP2_Back ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกต้องมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ได้แก่ *Eco* RI และ *Xho* I (ตารางที่ 3.4) ดังนี้คือ

ตัดครั้งที่ 1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I โดยเติมพลาสมิดดีเอ็นเอผสมในปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วย 1x Buffer R และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho* I จำนวน 1 unit จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 14 – 16 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปตรวจสอบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอว่าถูกตัดสมบูรณ์หรือไม่ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วจึงนำไปตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอลตามวิธีการข้อ 4.3.1.1

ตัดครั้งที่ 2 นำดีเอ็นเอที่ตกตะกอนได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI ตามวิธีการข้อ 4.2.9 จากนั้นนำไปตรวจสอบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วทำการสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอตามขนาดของชิ้นยีนที่ต้องการจากอะกาโรสเจลโดยใช้ชุด Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit ตามวิธีการข้อ 4.2.4

4.3.2.4 โคลนชิ้นส่วนยีน $\Delta 60N_VP1_Back$ และ $\Delta 60N_VP1_Front$ เข้าสู่เวกเตอร์ pET28-VP2_Front และ pET 28 - VP2_Back

นำชิ้นส่วนยีนและเวกเตอร์ซึ่งปลายทั้งสองข้างที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Xho* I (ข้อ 4.3.2.1) มาเชื่อมต่อกัน โดยชิ้นส่วนยีน $\Delta 60N_VP1_Back$ ถูกเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pET 28 - VP2_Front ได้เป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET 28 - VP2/ $\Delta 60N_VP1$ และชิ้นส่วนยีน $\Delta 60N_VP1_Front$ ถูกเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pET28-VP2_Front ได้เป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28- $\Delta 60N_VP1/VP2$ จากนั้นเคลื่อนย้ายสารผสมเข้าสู่รีคอมบิแนนท์เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat shock ตามวิธีการข้อ 4.2.6 และนำโคลนที่เกิดขึ้นไปตรวจสอบทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีชิ้นส่วนของยีน แล้วจึงเลือกโคลนที่ทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีชิ้นส่วนของยีนมาเพิ่มจำนวนและทำการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด High-SPEED Plasmid Mini kit ตามวิธีการข้อ 4.2.8 จากนั้นจึงตรวจสอบชิ้นยีนในรีคอมบิแนนท์ พลาสมิดด้วยวิธีการย่อยโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I กับ *Eco* RI และ *Eco* RI กับ *Xho* I แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตามวิธีการข้อ 4.2.10

4.3.3 สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET 28-VP2/Full length VP1

4.3.3.1 ตัดชิ้นส่วนยีน Syn_VP1 และเวกเตอร์ pET 28-VP2/ Δ 60N_VP1

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Syn_VP1 ที่ถูกต้อง (ข้อ 4.2.10) และเวกเตอร์ pET 28-VP2/ Δ 60N_VP1 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ได้แก่ *Eco* RI และ *Nhe* I (ตารางที่ 3.4) ดังนี้คือ

ตัดครั้งที่ 1 ตัดด้วย *Nhe* I โดยเติมพลาสมิดดีเอ็นเอผสมในปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วย 1x tango buffer และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nhe* I จำนวน 1 unit จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65° ซ เป็นเวลา 14 – 16 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล ตามวิธีการข้อ 4.3.1.1

ตัดครั้งที่ 2 นำดีเอ็นเอที่ตกตะกอนได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI ตามวิธีการข้อ 4.2.9 แล้วทำการสกัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอซึ่งถูกตัดตามขนาดที่ต้องการจากอะกาโรสเจล โดยใช้ชุด Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit ตามวิธีการข้อ 4.2.4

4.3.3.2 โคลนชิ้นส่วนยีน Syn_VP1 และเวกเตอร์ pET28-VP2/ Δ 60N_VP1

นำชิ้นส่วนยีน Syn_VP1 และเวกเตอร์ pET 28 - VP2/ Δ 60N_VP1 (ข้อ 4.3.3.1) ซึ่งปลายทั้งสองข้างถูกตัดด้วย *Eco* RI และ *Nhe*I มาเชื่อมต่อกันตามวิธีการข้อ 4.2.5.2 จากนั้นเคลื่อนย้ายสารผสมเข้าสู่คอมพิเพนต์เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat shock ตามวิธีการข้อ 4.2.6 และนำโคโลนีที่เกิดขึ้นไปตรวจสอบทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีชิ้นส่วนของยีนต่อไป แล้วจึงเลือกโคโลนีทรานสฟอร์มแมนท์ที่มีชิ้นส่วนของยีนมาเพิ่มจำนวนตามวิธีการข้อ 4.2.7 และทำการสกัดรีคอมบิแนนท์ พลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด High-SPEED Plasmid Mini kit ตามวิธีการข้อ 4.2.8 จากนั้นจึงตรวจสอบชิ้นยีนในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยวิธีการย่อยโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Nhe* I แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตามวิธีการข้อ 4.2.10

4.4 แสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในแบคทีเรีย *E.coli*

4.4.1 ทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์สำหรับแสดงออก รีคอมบิแนนท์โปรตีน

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (ข้อ 4.3.1 และ 4.3.2) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ถูกต้องจำนวน 5 นาโนกรัม เข้าสู่คอมพีเทนต์ *E.coli* สายพันธุ์ Roseta-gami ด้วยวิธี heat shock ตามวิธีการข้อ 4.2.6

4.4.2 คัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนที่เหมาะสมสำหรับแสดงออกรีคอมบิแนนท์โปรตีน

4.4.2.1 ชักนำให้โปรตีนแสดงออก

แยกโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดตามที่คัดเลือก (ข้อ 4.4.1) โดย streak เชื้อลงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 14 – 16 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยว จำนวน 7 โคลน เพื่อทำการเตรียมแบคทีเรียตั้งต้นโดยเชื้อโคโลนีเดี่ยวที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็งใส่ในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30° ซ พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 – 16 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) จากนั้นถ่ายแบคทีเรียตั้งต้น จำนวน 1.25 OD_{600} ลงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30° ซ พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที จนกระทั่ง OD_{600} เท่ากับ 0.4 – 0.6 แล้วจึงชักนำให้โปรตีนมีการแสดงออกด้วยการเติมสาร isopropyl- β -D-1-thiogalactoside (IPTG) ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30° ซ พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์ใส่ในหลอดไมโครพิวจีใหม่ หลอดละ 1 OD_{600} โดยแยกอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 5 นาที นำเซลล์ที่เก็บได้ไปวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และตรวจติดตามโปรตีนด้วยวิธี Western blotting analysis แล้วทำการเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนที่มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เหมาะสม จำนวน 3 โคลน จากนั้นทำการชักนำให้มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากรีคอมบิแนนท์โคลนทั้งสามโคลนที่เลือกอีกครั้ง ตามวิธีการข้างต้น แล้ววิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และตรวจติดตามโปรตีนด้วยวิธี Western blotting analysis ตามลำดับ จากนั้นจึงทำการเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนที่มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เหมาะสมที่สุดเพียงโคลนเดียว

4.4.2.2 วิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และตรวจติดตามโปรตีนด้วยวิธี Western blotting analysis

4.4.2.2.1 เตรียมตัวอย่างโปรตีนจากตะกอนเซลล์

เติมสารละลายผสมสำหรับเตรียมตัวอย่างโปรตีนจากตะกอนเซลล์ (4.4.2.1) ซึ่งประกอบด้วย 4x sample buffer ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร, สาร β -mercaptoethanol ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 32.5 ไมโครลิตร รวมปริมาตรเท่ากับ 50 ไมโครลิตรต่อเซลล์ 1 OD₆₀₀ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4° ซ ดูดส่วนใสไปวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE

4.4.2.2.2 วิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี SDS – PAGE

ดูดส่วนใสที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างโปรตีน (4.4.2.2.1) ลงใน หลุมบนเจล SDS จำนวน 2 แผ่น ซึ่งเจล SDS สามารถเตรียมได้จากส่วนผสม ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 การเตรียมเจล SDS สำหรับวิเคราะห์โปรตีน

สารที่ใช้	13% separating gel (มิลลิลิตร ต่อ 20 มิลลิลิตร)	5% stacking gel (มิลลิลิตร ต่อ 10 มิลลิลิตร)
น้ำกลั่น	5.95	6.8
1.5 M Tris - HCl (pH 8.8)	5	-
1 M Tris - HCl (pH 6.8)	-	1.25
10% SDS	0.2	0.1
30% acrylamide mix	8.65	1.7
TEMED	0.008	0.01
10% ammonium persulfate (APS)	0.2	0.1

จากนั้นทำการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 90 โวลต์ เป็นเวลา 140 นาที จากนั้นนำเจลแผ่นที่หนึ่งไปย้อมสีด้วยการแช่ใน staining solution (ภาคผนวก) ทำการเขย่าเป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างสีออกจากเจลด้วยการแช่ใน destaining solution (ภาคผนวก) ทำการเขย่าจนแผ่นเจลใส จากนั้นทำให้เจลคงสภาพด้วยการแช่ใน fix solution (ภาคผนวก) ส่วนเจลอีกแผ่นนำไปตรวจติดตามโปรตีนด้วยวิธี Western blotting analysis

4.4.2.3 ตรวจติดตามโปรตีนด้วยวิธี Western blotting analysis

4.4.2.3.1 โอนถ่ายโปรตีนจากเจลไปยัง polyvinylidene fluoride

(PVDF) membrane

นำแผ่นเจลที่ได้จากการแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS – PAGE ซึ่งไม่ผ่านการย้อมสี นำมาตัดส่วนของ stacking gel ออก จากนั้นจึงนำไปแช่ใน transfer buffer (ภาคผนวก) เป็นเวลา 15 นาที และทำการตัด PVDF membrane และ thick blot paper จำนวน 2 แผ่นตามขนาดของ separating gel จากนั้นนำไปแช่ใน transfer buffer เป็นเวลา 15 นาที โดยก่อนแช่ PVDF membrane ใน transfer buffer จะต้องแช่ PVDF membrane ใน absolute methanol ให้ทั่วทั้งแผ่น เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำปลอดประจุ จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำทั้งแผ่นเจล SDS, PVDF membrane และ thick blot paper วางบนเครื่อง semi-dry transfer cell โดยจัดวางดังนี้ นำ thick blot paper แผ่นที่หนึ่งวางด้านล่างสุด จากนั้นตามด้วย PVDF membrane และแผ่นเจล SDS ตามลำดับ แล้วปิดทับด้วย thick blot paper แผ่นที่สอง แล้วจึงเท transfer buffer ให้ชุ่ม จากนั้นไล่ฟองอากาศโดยใช้หลอดแก้วกลิ้งบน thick blot paper ด้านบนสุดเบาๆ ก่อนปิดฝาเครื่อง แล้วให้กระแสไฟฟ้าคงที่ 120 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 90 นาที ต่อ 1- 2 เจล

4.4.2.3.2 ตรวจติดตามสัญญาณด้วยวิธี Chemiluminescence และ

autoradiography

นำแผ่น PVDF membrane ที่ได้รับการถ่ายโอนโปรตีนแล้ว (ข้อ 4.4.2.3.1) แช่ใน blocking buffer (ภาคผนวก) เขย่าเป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำ PVDF membrane บ่มกับแอนติบอดีปฐมภูมิในอัตราส่วนที่เหมาะสม (ภาคผนวก) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงล้างด้วยสารละลาย PBST เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง และ 15 นาที จำนวน 2 ครั้งตามลำดับ จากนั้นจึงบ่ม PVDF membrane ด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิในอัตราส่วนที่เหมาะสม (ภาคผนวก) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงล้างด้วยสารละลาย PBST เทสารละลายซึบสเตรท (ภาคผนวก) ลงบน PVDF membrane เขย่าเป็นเวลา 1 นาที แล้ววาง PVDF membrane คว่ำหน้าลงบนพลาสติกใส ซึบสารละลายซึบสเตรทส่วนเกินด้วยกระดาษทิชชู ก่อนห่อด้วยพลาสติกใส จากนั้นวาง PVDF membrane ที่ห่อด้วยพลาสติกลงบนภาตประคบฟิล์มชนิดม้วนด้านใดด้านหนึ่ง โดยหงาย PVDF membrane ขึ้นแล้วติดกระดาษแก้วไว้ที่มุมทั้ง 4 ด้านเพื่อป้องกันการเคลื่อนของ PVDF membrane จากนั้นจึงนำไปประคบฟิล์ม X – Ray และล้างฟิล์มในห้องมืด

4.4.3 ทหาภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของโปรตีนในแบคทีเรีย *E.coli*

4.4.3.1 ทหาความเข้มข้นของ IPTG ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน

นำโคโลนีเดี่ยวของรีคอมบิแนนท์โคลนที่มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 4.4.2.1 มาเตรียมแบคทีเรียตั้งต้นโดยเชื้อโคโลนีเดี่ยวที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็งใส่ในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 มิลลิลิตร จากนั้นถ่ายแบคทีเรียตั้งต้นจำนวน 3 เท่าของ 1.25 OD ลงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ° ซ พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที จนกระทั่ง OD₆₀₀ เท่ากับ 0.4 – 0.6 แล้วจึงทำการแบ่งสารละลายเซลล์ลงในฟลาส ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตรละ 10 มิลลิลิตร เท่าๆกัน จำนวน 8 ฟลาส จากนั้นชักนำให้โปรตีนมีการแสดงออกด้วยการเติม IPTG ที่มีความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 และ 0.7 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ โดยมี 0 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวควบคุม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30° ซ พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์ใส่ในหลอดไมโครพิวเจอร์ใหม่ หลอดละ 1 OD₆₀₀ โดยแยกอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่เก็บได้ไปวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และตรวจติดตามโปรตีนด้วยวิธี Western blotting analysis ตามวิธีการข้อ 4.4.2.2 แล้วจึงทำการเลือกความเข้มข้นของ IPTG ที่เหมาะสมซึ่งสามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเหมาะสมที่สุด

4.4.3.2 ทหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

4.4.3.2.1 ทหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน

นำโคโลนีเดี่ยวของรีคอมบิแนนท์โคลนที่มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 4.4.2.1 มาเตรียมแบคทีเรียตั้งต้นโดยเชื้อโคโลนีเดี่ยวที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็งใส่ในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ทำการแบ่งสารละลายเซลล์ลงในหลอดเลี้ยงเชื้อ ขนาด 15 มิลลิลิตร ปริมาตรละ 5 มิลลิลิตร เท่าๆกัน จำนวน 3 หลอด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ ตามลำดับ พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 – 16 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายแบคทีเรียตั้งต้น จำนวน 1.25 OD ลงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 16° ซ, 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ ตามลำดับ พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที จนกระทั่ง OD₆₀₀ เท่ากับ 0.4 – 0.6 แล้ว

จึงชักนำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนเกิดการแสดงออกของด้วยการเติม IPTG ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.3.1 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16° ซ, 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ ตามลำดับ พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วทำการเก็บเซลล์ใส่ในหลอดไมโครพิวจ์ใหม่หลอดละ 1 OD โดยแยกอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงนำเซลล์ที่เก็บได้ไปวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และตรวจติดตามโปรตีนด้วยวิธี Western blotting analysis ตามวิธีการข้อ 4.4.2.2 และทำการศึกษาคูณสมบัติการละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่อุณหภูมิต่างๆในขั้นต่อไป

4.4.3.2.2 ทดสอบคุณสมบัติการละลายของโปรตีนที่อุณหภูมิต่างๆ

4.4.3.2.2.1 การแยกส่วน supernatant และ cell debris

ชั่งน้ำหนักของตะกอนเซลล์ที่เก็บได้ 1 OD ในหน่วยมิลลิกรัม จากข้อ 4.4.3.2.1 จากนั้นเติม ENZhanche lysis buffer ปริมาตรเป็น 2-3 เท่าของน้ำหนักของตะกอนเซลล์ ทำการละลายโปรตีนทั้งหมดออกจากเซลล์ด้วยเครื่อง vortex โดยปั่นผสมทุกๆ 5 นาที ในระหว่างที่แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการเติมเอนไซม์ Dnase I จำนวน 1 unit แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที ก่อนจะนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นดูส่วนใสซึ่งเป็นส่วน supernatant ออกจากส่วนตะกอนซึ่งเป็นส่วน cell debris ใส่ลงในหลอดไมโครพิวจ์ใหม่แล้วนำไปตกตะกอนโปรตีนด้วย trichloroacetic acid (TCA) (ตามวิธี 4.4.3.2.2) ส่วน cell debris นำไปล้างด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 10 นาที ดูส่วนใสทิ้งและทำการล้างซ้ำอีกครั้ง จากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS - PAGE และตรวจติดตามโปรตีนด้วยวิธี Western blotting analysis ตามวิธีการข้อ 4.4.2.2

4.4.3.2.2.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วย trichloroacetic acid

(TCA)

นำส่วน supernatant (ข้อ 4.4.3.2.1) มาเติม trichloroacetic acid (TCA) เข้มข้น ปริมาตร 1 ใน 10 ของปริมาตร supernatant เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ TCA สุดท้าย เท่ากับ 10% (v/v) TCA จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 20 นาที ดูส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนโปรตีนด้วยการเติม acetone ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรของสารผสมระหว่าง supernatant กับ TCA ผสมให้เข้ากัน ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นดูส่วนใสทิ้งและทิ้งไว้ให้ตะกอนโปรตีนแห้ง จากนั้นจึงละลายโปรตีนด้วยสารละลาย 0.1 N NaOH ปริมาตร 32.5 ไมโครลิตร แล้วจึงเติม 4x sample buffer ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร และ β - mercaptoethanol ปริมาตร 5 ไมโครลิตร

ตามลำดับ รวมปริมาตรเท่ากับ 50 ไมโครลิตรต่อเซลล์ 1 OD₆₀₀ ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4° ซ จากนั้นจึงดูดส่วนใสไปวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และตรวจติดตามโปรตีนด้วยวิธี Western blotting analysis ตามวิธีการข้อ 4.4.2.2

จากนั้นทำการเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมที่รีคอมบิแนนท์โคลนสามารถแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้อย่างเหมาะสมและมีคุณสมบัติการละลายที่ดีที่สุด

4.4.3.3 ทหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน

นำโคโลนีเดี่ยวของรีคอมบิแนนท์โคลนที่มีการแสดงออกของโปรตีนที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 4.4.2.1 มาทำการเตรียมแบคทีเรียตั้งต้นโดยเชื้อโคโลนีเดี่ยวที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็งใสในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.3.2 พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 - 16 ชั่วโมง แล้วจึงถ่ายแบคทีเรียตั้งต้นจำนวน 3 เท่าของ 1.25 OD₆₀₀ ลงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที จนกระทั่ง OD₆₀₀ เท่ากับ 0.4 - 0.6 จึงชักนำให้โปรตีนมีการแสดงออกด้วยการเติม IPTG ความเข้มข้นที่เหมาะสมจาก ข้อ 4.4.3.1 ทำการแบ่งสารละลายเซลล์ลงในฟลาส ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตรละ 10 มิลลิลิตร เท่าๆกัน จำนวน 4 ฟลาส จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที โดยใช้เวลาที่ 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับแล้วทำการเก็บเซลล์ใส่ในหลอดไมโครพิวจีใหม่ หลอดละ 1 OD₆₀₀ โดยแยกอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่เก็บได้ไปวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และตรวจติดตามโปรตีนด้วยวิธี Western blotting analysis ตามวิธีการข้อ 4.4.2.2 แล้วทำการเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนมีการแสดงออกที่เหมาะสมที่สุด

4.5 ทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์

4.5.1 ขยายขนาดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน

นำโคลนเดี่ยวของรีคอมบิแนนท์โคลนที่มีการแสดงออกของโปรตีนที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 4.4.2.1 มาทำการเตรียมแบคทีเรียตั้งต้นโดยเชื้อโคลนเดี่ยวที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็งใส่ในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.3.2 พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 – 16 ชั่วโมงจากนั้นถ่ายแบคทีเรียตั้งต้น จำนวน 3 เท่าของ 1.25 OD_{600} ลงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที จนกระทั่ง OD_{600} เท่ากับ 0.4 – 0.6 จากนั้นจึงชักนำให้โปรตีนมีการแสดงออกด้วยการเติม IPTG ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.3.1 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที โดยใช้ระยะเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.3.3 แล้วจึงทำการเก็บเซลล์ใส่ในหลอดเซนทริฟิวจ์ใหม่ ขนาด 15 มิลลิลิตร หลอดละ 25 OD_{600} โดยแยกอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำเซลล์ 25 OD_{600} ที่เก็บได้ไปทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ในขั้นต่อไป นอกจากนี้ยังทำการเก็บเซลล์ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ใหม่ หลอดละ 1 OD_{600} โดยแยกอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งด้วยการปั่นเหวี่ยงแล้วไปวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และตรวจติดตามโปรตีนด้วยวิธี Western blotting analysis ตามวิธีการข้อ 4.4.2.2 เพื่อยืนยันว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนมีการแสดงออก ก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์

4.5.2 ทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี

4.5.2.1 เตรียมสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีคุณสมบัติการละลาย (soluble form)

ชั่งน้ำหนักตะกอนเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนที่ทดสอบแล้วว่าสามารถละลายได้จำนวน 25 OD_{600} จากข้อ 4.5.1 มาเติม ENZhanche lysis buffer ปริมาตรเป็น 2-3 เท่าของน้ำหนักของตะกอนเซลล์และละลายโปรตีนทั้งหมดออกจากเซลล์ด้วยเครื่อง vortex โดยปั่นผสมทุกๆ 5 นาที ในระหว่างที่แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการเติมเอนไซม์ DNase I จำนวน 10 unit แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที ก่อนจะนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นดูดส่วนใสซึ่งเป็นส่วน supernatant ใส่ในหลอดเซนทริฟิวจ์ใหม่ ขนาด 15 มิลลิลิตร ทำการปรับ

ปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตรด้วย SP binding buffer (ภาคผนวก) จากนั้นทำการกรองสารละลายโปรตีนด้วย syringe filter ขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีในขั้นต่อไป

4.5.2.2 ละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีคุณสมบัติไม่ละลาย (inclusion bodies form)

นำตะกอนเซลล์ที่มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนซึ่งทดสอบแล้วว่าไม่สามารถละลายได้และอยู่ในรูป inclusion bodies จากข้อ 4.5.1 มาเติม PCL lysis buffer (ภาคผนวก) ปริมาตร 0.1 เท่าของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เก็บเซลล์ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำให้เซลล์แตกออกด้วยวิธี sonication ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที จนมีลักษณะใส แล้วนำมาแช่ น้ำแข็ง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะสังเกตเห็นตะกอนสีขาวขุ่นของ SDS ปรากรู จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4° ซ เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงดูดส่วนใสในหลอด เซนทริฟิวจ์ใหม่ ขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรของสารละลายโปรตีนเป็น 5 มิลลิลิตร ด้วย PCW binding buffer (ภาคผนวก) แล้วกรองสารละลายโปรตีนด้วย syringe filter ขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีต่อไป

4.5.2.3 ทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำสารละลายโปรตีนที่กรองแล้วหรือ crude extract จากข้อ 4.5.2.1 หรือ 4.5.2.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผ่านคอลัมน์ Ni – NTA affinity chromatography ซึ่งผ่านการเติม ประจุและทำให้อิ่มตัวด้วย SP binding buffer หรือ PCW binding buffer ปริมาตร 30 มิลลิลิตร แล้วเก็บส่วนที่ผ่านคอลัมน์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็น flow through fraction จากนั้นผ่านคอลัมน์ ด้วย SP elution buffer (ภาคผนวก) หรือ PCE elution buffer (ภาคผนวก) ที่มีความเข้มข้นของ imidazole เท่ากับ 40 และ 60 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรละ 20 มิลลิลิตร ตามด้วยความเข้มข้นของ imidazole เท่ากับ 100, 200 และ 300 มิลลิโมลาร์ ปริมาตรละ 10 มิลลิลิตรตามลำดับ จากนั้นชะ โปรตีนที่ยังคงค้างอยู่ในคอลัมน์ออกมาด้วย strip buffer (ภาคผนวก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดย เก็บแต่ละส่วนที่ผ่านคอลัมน์ทั้งหมดในทุกๆ fraction แล้วนำบางส่วนของแต่ละ fraction มา ตกตะกอนโปรตีน TCA ตามวิธีการข้อ 4.4.3.2.2.2 จากนั้นนำไปวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และตรวจติดตามโปรตีนด้วยวิธี Western blotting analysis ตามวิธีการข้อ 4.4.2.2 แล้วจึงหา ปริมาณรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ในแต่ละ fraction จากเจล SDS โดยเทียบความเข้มของแถบ โปรตีนกับแถบโปรตีน Bovine serum albumin (BSA) ที่ทราบความเข้มข้นแล้ว

4.5.2.4 กำจัดสาร sarkosyl และ imidazole ออกโดยวิธี dialysis

รวบรวมส่วนที่ผ่านคอลัมน์เฉพาะส่วน (fraction) ที่มีรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ จากข้อ 4.5.2.3 มาเพิ่มความเข้มข้นโดยวิธี aquasorbition ก่อนทำ dialysis เพื่อกำจัดสาร sarkosyl และ imidazole โดยดูดสารละลายจาก fraction ที่มีรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ใส่ในถุง dialysis ซึ่งถูกตัดให้มีความยาวเหมาะสมกับปริมาณสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ที่เติมลงไปโดยนำถุงไปต้มในสารละลาย 1% EDTA ที่เดือด เป็นเวลา 10 นาที และล้างถุงด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ก่อนนำไปใช้ จากนั้นทำการผูกถุงโดยปลายข้างหนึ่งถูกมัดด้วยเชือกจนแน่นแล้วจึงค่อยเติมสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ลงไปแล้วผูกปลายถุงอีกข้างหนึ่งด้วยเชือกให้แน่นเช่นเดียวกัน จากนั้นใส่ถุงลงในสาร carboxymethyl cellulose (CMC) แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อดูดซับน้ำออกเมื่อปริมาตรของสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ในถุงลดลงเหลือปริมาตร 2 – 3 มิลลิลิตร ดูดสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ที่เพิ่มความเข้มข้นแล้วใส่ในถุง dialysis ซึ่งถูกตัดให้มีความยาวเป็นหนึ่งเท่าของความยาวของถุงที่ใส่ปริมาณสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ลงไป แล้วนำถุง dialysis จุ่มใน 1x dialysis buffer โดยใช้อัตราส่วนระหว่างปริมาตรของสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ต่อ 1x dialysis buffer เท่ากับ 1:2,000 โดยวางภาชนะที่ใส่ buffer อยู่ในน้ำแข็งและกวนตลอดเวลา และทำการเปลี่ยน 1x dialysis buffer ทุก 2, 4 และ 12 ชั่วโมงตามลำดับ แล้วจึงนำถุง dialysis มาเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี aquasorbition โดยใช้สาร CMC จนปริมาตรของสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ในถุงลดลงเหลือ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จึงทำการเก็บสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์จากถุง แล้วนำไปวัดความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยวิธี Bradford assay และนำไปทดสอบคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนต่อไป

4.5.2.5 วัดความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยวิธี Bradford assay

ทำการเจือจางสารละลายมาตรฐานโปรตีน Bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย 1x dialysis buffer (ภาคผนวก) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติม 1x dye reagent ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลอดลงในไมโครเพลท 96 หลุม แล้วจึงเติมสารละลายมาตรฐานโปรตีน BSA ทั้ง 5 ระดับความเข้มข้น ตัวอย่างโปรตีนจากข้อ 4.5.2.4 และสารละลาย 1x dialysis buffer ซึ่งใช้เป็น Blank หลุมละ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที โดยทำการทดสอบ 2 ซ้ำ จากนั้นนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (OD_{595}) ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (ELx800, Bio-Tek) แล้วนำผลต่างระหว่างค่าเฉลี่ย OD_{595} ของสารละลายมาตรฐานโปรตีน BSA กับค่าเฉลี่ย OD_{595} ของ Blank (ΔOD_{595}) ไปสร้างกราฟมาตรฐานเส้นตรงเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างสารละลายมาตรฐานโปรตีน BSA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับค่า ΔOD_{595} แล้วนำสมการเส้นตรงที่ได้ไปใช้คำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนตัวอย่าง

4.5.2.6 ทดสอบคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของรีคอมบิแนนท์โปรตีน

นำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่บริสุทธิ์และผ่านกระบวนการ dialysis แล้วจากข้อ 4.5.2.4 มาทดสอบด้วยวิธี Western blotting analysis ตามวิธีการข้อ 4.4.2.2 กับตัวอย่างซีรัมไก่ที่ให้ผลบวกและผลลบจากการทดสอบด้วยชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูปยี่ห้อ IDEXX โดยใช้ตัวอย่างซีรัมไก่เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ ซึ่งถูกเจือจางด้วย blocking buffer ในอัตราส่วน 1:5,000 และใช้ horseradish peroxidase-rabbit anti-chicken/turkey IgG (H+L) (Invitrogen) เป็นแอนติบอดีทุติยภูมิ ซึ่งถูกเจือจางด้วย blocking buffer ในอัตราส่วน 1:4,000 และทำการยืนยันผลด้วยวิธี Western blotting analysis โดยใช้ anti-His monoclonal antibody, anti-VP1 และ anti-VP2 polyclonal antibody ซึ่งถูกเจือจางด้วย blocking buffer ในอัตราส่วน 1:4,000 เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิและใช้ horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG หรือ horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG ซึ่งถูกเจือจางด้วย blocking buffer ในอัตราส่วน 1:4,000 เป็นแอนติบอดีทุติยภูมิ



4.6 ประยุกต์ใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CAV ด้วยวิธี indirect enzyme linked immunosorbant assay (indirect ELISA)

4.6.1 หาความเหมาะสมของวิธี checkerboard titration assay (CBT)

4.6.1.1 หาปริมาณแอนติเจนและระดับการเจือจางของตัวอย่างซีรัมไก่

4.6.1.1.1 เคลือบแอนติเจนลงบนไมโครเพลท

ทำการเคลือบไมโครเพลทกันเรียบ 96 หลุม ด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ หลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยทำการเจือจางรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ที่บริสุทธิ์ และทราบความเข้มข้นแล้วจากข้อ 4.5.2.5 ด้วยสารละลาย coating buffer (ภาคผนวก) ให้ได้ปริมาณรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ดังนี้ 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 and 20 นาโนกรัมต่อหลุม แล้วเติมสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ลงในแต่ละแถว ตามตารางที่ 4.6 จากนั้นปิดหน้าเพลท เพื่อป้องกันการระเหยแล้ววางทิ้งไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 8 -12° ซ ชั่วโมง แล้วจึงนำไปทดสอบตัวอย่างซีรัมไก่ที่ระดับการเจือจางต่างๆในขั้นต่อไป

ตารางที่ 4.6 แสดงการเคลือบไมโครเพลทด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ที่ปริมาณต่างๆ

แถวที่	ปริมาณคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (นาโนกรัมต่อหลุม)
A	20
B	10
C	5
D	2.5
E	1.25
F	0.625

4.6.1.1.2 ทดสอบแอนติบอดีในตัวอย่างซีรัมไก่ที่ระดับการเจือจางต่างๆ

นำไมโครเพลทที่เคลือบด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ จากข้อ 4.6.1.1.1 มาดูดสารละลายในแต่ละหลุมทิ้ง จากนั้นล้างด้วย washing buffer (ภาคผนวก) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วดูดทิ้งและซับด้วยกระดาษทิชชู จำนวน 3 ครั้ง แล้วจึงเติมตัวอย่างซีรัมบวกซึ่งเป็นตัวอย่างซีรัมไก่ที่ทดสอบด้วยชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูป ยี่ห้อ IDEXX แล้วให้ผลบวก จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ P1, P2 และ P3 และตัวอย่างซีรัมลบซึ่งเป็นตัวอย่างซีรัมที่ทดสอบด้วยชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูป ยี่ห้อ IDEXX แล้วให้ผลลบ (N) จำนวน 1 ตัวอย่าง โดยทำการเจือจางตัวอย่างซีรัมด้วย blocking buffer (ภาคผนวก) ในไมโครเพลทสำหรับเจือจาง (dilution plate) ที่ระดับการเจือจางจำนวน 5 ระดับ ดังนี้คือ 1:10, 1:50, 1:100, 1:200 และ 1:400 (ตารางที่ 4.7) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงล้างด้วย washing buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นจึงเติมสารคอนจูเกตหรือแอนติบอดีทุติยภูมิเป็น horseradish peroxidase-rabbit anti-chicken/turkey IgG (H+L) (Invitrogen) ซึ่งเจือจางด้วย blocking buffer ที่ระดับการเจือจาง 1:2,000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงล้างด้วย washing buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 ครั้ง ก่อนเติม TMB substrate buffer (ภาคผนวก) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ซึ่งทำให้สารละลายเกิดสีฟ้า จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม stop solution (ภาคผนวก) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม สารละลายสีฟ้าจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (OD_{450}) ซึ่งค่าที่ได้จะถูกนำไปคำนวณหาค่าอัตราส่วนระหว่าง OD_{450} ของตัวอย่างซีรัมบวกและลบ (Signal to noise ratio หรือ S/N) ตามสูตร ดังนี้

$$\text{Signal to noise ratio หรือ S/N} = \frac{OD_{450} \text{ ของตัวอย่างซีรัมบวก}}{OD_{450} \text{ ของตัวอย่างซีรัมลบ}}$$

จากนั้นทำการเลือกปริมาณรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ น้อยสุด และระดับการเจือจางของตัวอย่างซีรัมสูงสุดซึ่งแสดงค่า S/N สูงสุด และ OD_{450} ของตัวอย่างซีรัมลบ (Background) มีค่าต่ำ เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาเลือกปริมาณโปรตีนแอนติเจนและระดับการเจือจางของตัวอย่างซีรัมที่เหมาะสมสำหรับวิธี indirect ELISA

ตารางที่ 4.7 แสดงการเจือจางตัวอย่างซีรัมที่ระดับต่างๆ ในแต่ละคอลัมน์ของไมโครเพลท

คอลัมน์ที่	1	2	3	4	5
ระดับการเจือจางตัวอย่างซีรัม	1:10	1:50	1:100	1:200	1:400

4.6.1.2 ทหาระดับการเจือจางของสารคอนจูเกตหรือแอนติบอดีทุติยภูมิ

นำรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ มาเคลือบลงในหลุมบนไมโครเพลทกันเรียบ 96 หลุม ในปริมาณที่เหมาะสมตามข้อ 4.6.1.1 จากนั้นทดสอบตัวอย่างซีรัมบวกและลบซึ่งเป็นตัวอย่างเดียวกับตัวอย่างที่ใช้ทดสอบในข้อ 4.6.1.1 โดยเจือจางในระดับที่เหมาะสมตามข้อ 4.6.1.1 และใช้สารคอนจูเกตที่เจือจางด้วย blocking buffer ที่ระดับต่างๆ ดังนี้คือ 1:2,000, 1:4,000, 1:6,000 และ 1:8,000 ตามตารางที่ 4.8 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ผลจากการอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (OD_{450}) นำไปคำนวณหาค่าอัตราส่วนระหว่าง OD_{450} ของตัวอย่างซีรัมบวกและลบ (Signal to noise ratio หรือ S/N) แล้วจึงทำการเลือกระดับการเจือจางของสารคอนจูเกตสูงสุดซึ่งแสดงค่า S/N สูงสุด และ OD_{450} ของตัวอย่างซีรัมลบ (Background) มีค่าต่ำ เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาเลือกระดับการเจือจางของสารคอนจูเกตที่เหมาะสมสำหรับวิธี indirect ELISA

ตารางที่ 4.8 แสดงการเจือจางสารคอนจูเกตที่ระดับต่างๆ ในแต่ละคอลัมน์ของไมโครเพลท

คอลัมน์ที่	1	2	3	4
ระดับการเจือจางของสารคอนจูเกต	1:2,000	1:4,000	1:6,000	1:8,000

4.6.2 ทดสอบหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CAV ในตัวอย่างซีรัมไก่

4.6.2.1 ทดสอบตัวอย่างซีรัมด้วยวิธี indirect ELISA

นำตัวอย่างซีรัมไก่ซึ่งทดสอบด้วยชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูปยี่ห้อ IDEXX แล้วจำนวน 152 ตัวอย่างมาทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ตามสรุปขั้นตอนในภาคผนวก โดยใช้ปริมาณโปรตีนแอนติเจนและระดับการเจือจางของตัวอย่างซีรัมและสารคอนจูเกตที่เหมาะสม ซึ่งการทดสอบตัวอย่างซีรัมในแต่ละชุดของไมโครเพลท ELISA จะทดสอบพร้อมกับตัวอย่างซีรัมควบคุมบวกและลบ โดยทำการทดสอบ จำนวน 2 ซ้ำในทุกๆ ตัวอย่าง ซึ่งผลจากการอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (OD_{450}) เฉลี่ยของตัวอย่างทดสอบจะถูกนำไปคำนวณหาค่าร้อยละอัตราส่วนระหว่าง sample ต่อ positive (%S/P) ตามสูตร ดังนี้

$$\%S/P = \frac{(OD_{450} \text{ ของตัวอย่างซีรัมทดสอบ} - OD_{450} \text{ ของตัวอย่างทดสอบซีรัมควบคุมลบ}^a) \times 100}{(OD_{450} \text{ ของตัวอย่างซีรัมควบคุมบวก}^b - OD_{450} \text{ ของตัวอย่างทดสอบซีรัมควบคุมลบ}^a)}$$

ซีรัมควบคุมลบ คือ ซีรัมที่ให้ผลการทดสอบลบด้วยชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูปยี่ห้อ IDEXX และให้ค่า OD_{450} จากการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ในระดับต่ำอยู่ในช่วง 0.228 ± 0.017 ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ย OD_{450} จากการทดสอบจำนวน 8 ซ้ำ

ซีรัมควบคุมบวก คือ ซีรัมที่ให้ผลการทดสอบบวกด้วยชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูปยี่ห้อ IDEXX และให้ค่า OD_{450} จากการทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ในระดับสูงอยู่ในช่วง 1.189 ± 0.122 ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ย OD_{450} จากการทดสอบ จำนวน 8 ซ้ำ

4.6.2.2 ทาค่า Cut off ของวิธี indirect ELISA

ค่า Cut off ของวิธี indirect ELISA หาจากผลทดสอบด้วยวิธี indirect – ELISA ของตัวอย่างซีรัม จำนวน 152 ตัวอย่าง ซึ่งแสดงเป็นค่า %S/P และผลทดสอบชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูปยี่ห้อ IDEXX ซึ่งแสดงเป็นผลบวกหรือลบ ซึ่งข้อมูลทั้งสองได้ถูกนำมาวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์ทางสถิติ two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC) analysis [61] ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป MedCalc® version 15.2.2 software โดยทุกค่า %S/P ถูกกำหนดให้เป็นค่า Cut off แล้วเปรียบเทียบผลทดสอบวิธี indirect – ELISA กับชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูป (IDEXX) ในแต่ละ Cut off จึงได้ค่าความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ของวิธี indirect – ELISA ของแต่ละค่า Cut off จากนั้นจึงนำไปสร้างกราฟ TG-ROC เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง sensitivity และ specificity ของวิธี indirect – ELISA กับค่า Cut off โดยค่า Cut off ที่เหมาะสมจะพิจารณาเลือกค่า Cut off ณ จุดตัดระหว่างเส้นของ sensitivity กับเส้นของ specificity (d_0) และให้ค่า Youden index J สูงสุด ตามวิธีการพิจารณาค่า Cut off ของ Greiner (2000) [62] ซึ่งค่า Youden index J สามารถคำนวณได้ตามสูตร ดังนี้

$$\text{ค่า Youden index } J = (\text{Sensitivity} + \text{Specificity}) - 1$$

4.6.2.3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี indirect ELISA กับชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูปยี่ห้อ IDEXX

4.6.2.3.1 หาค่าความไว (sensitivity), ความจำเพาะ (specificity) และความแม่นยำ (accuracy) ของวิธี indirect ELISA

นำผลทดสอบตัวอย่างซีรัมไก่ จำนวน 152 ตัวอย่าง มาเปรียบเทียบผลทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA และชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูปยี่ห้อ IDEXX ซึ่งใช้เป็นวิธีมาตรฐาน ตามรูปแบบตาราง 2 x 2 ดังตารางที่ 4.9 จากค่าในตารางดังกล่าวจะถูกนำไปคำนวณหาค่าความไว (sensitivity), ความจำเพาะ (specificity) และความแม่นยำ (accuracy) ของวิธี indirect ELISA อยู่ในรูปร้อยละตามสูตร [63] ดังนี้

ตารางที่ 4.9 แสดงการเปรียบเทียบผลทดสอบการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CAV ในตัวอย่างซีรัมไก่ด้วยวิธี indirect ELISA และชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูปยี่ห้อ IDEXX

วิธีทดสอบ		Indirect ELISA (In-house method)		
		ผลบวก	ผลลบ	รวม
IDEXX [®] ELISA (Standard method)	ผลบวก	a	b	a+b
	ผลลบ	c	d	c+d
	รวม	a+c	b+d	a+b+c+d

$$\text{ร้อยละค่าความไว (sensitivity)} = \frac{\text{ผลบวกจริง (a)}}{\text{ผลบวกจริง (a) + ผลลบปลอม (b)}} \times 100$$

$$\text{ร้อยละค่าความจำเพาะ (specificity)} = \frac{\text{ผลลบจริง (d)}}{\text{ผลลบจริง (d) + ผลบวกปลอม (c)}} \times 100$$

$$\text{ร้อยละค่าความแม่นยำ (accuracy)} = \frac{\text{ผลบวกตรงกันของทั้งสองวิธี (a+d)}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด (a+b+c+d)}} \times 100$$

4.6.2.3.2 ทหาระดับความสอดคล้องของผลการทดสอบระหว่างวิธี indirect ELISA กับชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูปยี่ห้อ IDEXX

เปรียบเทียบผลทดสอบระหว่างวิธี indirect ELISA กับชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูปยี่ห้อ IDEXX ในตารางที่ 4.9 โดยนำไปวิเคราะห์หาระดับความสอดคล้องของผลทดสอบระหว่างทั้งสองวิธีซึ่งแสดงเป็นค่า *Kappa* (*K* value) ด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad software (GraphPad, La jolla, CA, USA) ค่า *Kappa* ที่คำนวณได้จะนำไปพิจารณาระดับความสอดคล้องของทั้งสองวิธีตามเกณฑ์ของ Landis และ Koch (1997) [64] ดังนี้

$K \text{ value} < 0.20$	จัดอยู่ในระดับต่ำ (Poor)
$0.21 \leq K \text{ value} \leq 0.40$	จัดอยู่ในระดับพอใช้ (Fair)
$0.41 \leq K \text{ value} \leq 0.60$	จัดอยู่ในระดับปานกลาง (Moderate)
$0.61 \leq K \text{ value} \leq 0.80$	จัดอยู่ในระดับดี (Good)
$0.81 \leq K \text{ value} \leq 1.00$	จัดอยู่ในระดับดีมาก (Very good)

4.7 ประยุกต์ใช้โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ สำหรับผลิตพอลิโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ในหนูไมซ์

4.7.1 เตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

นำรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60VP1$ บริสุทธิ์ซึ่งถูกกำจัดสาร sarkosyl และ imidazole ออกแล้วด้วยวิธี dialysis โดยใช้สารละลาย 1xPBS เป็น dialysis buffer จากนั้นนำโปรตีนไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay โดยใช้สารละลาย 1xPBS เป็น Blank

4.7.2 ฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ในหนูไมซ์

ทำการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูไมซ์สายพันธุ์ BALB/c เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ จำนวน 2 ตัว ด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ จากข้อ 4.7.1 โดยฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันของหนูแต่ละตัว จำนวน 4 ครั้ง ดังนี้ ฉีดกระตุ้นครั้งแรกเข้าภายในช่องท้องหนูด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ปริมาณ 10 ไมโครกรัม ปริมาตร 150 ไมโครลิตรโดยผสมกับ Freund's complete adjuvant (FCA) ในปริมาตร 150 ไมโครลิตร โดยใช้อัตราส่วนระหว่างปริมาตรของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ต่อปริมาตรของสารแอดจูแวนซ์ เท่ากับ 1:1 เมื่อครบ 2 และ 4 สัปดาห์ทำการฉีดกระตุ้นซ้ำครั้งที่ 2 และ 3 ตามลำดับ โดยฉีดเข้าภายในช่องท้องหนูด้วยรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ซึ่งผสมกับ Freund's incomplete adjuvant (FIA) โดยใช้อัตราส่วนระหว่างปริมาตรของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ต่อปริมาตรของสารแอดจูแวนซ์ เท่ากับ 1:1 โดยทำการเก็บเลือดจากหนูไมซ์ที่ทางก่อนทำการฉีดกระตุ้นครั้งแรก 1 สัปดาห์ สำหรับใช้เป็น Pre-immune serum และเก็บเลือดทุกๆ 1 สัปดาห์หลังฉีดกระตุ้นแต่ละครั้ง รวมเป็นจำนวน 3 ครั้ง โดยเลือดที่เก็บได้จะนำไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ซ้ำมคืน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใส จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4°C ในระยะสั้น หรือเก็บที่อุณหภูมิ -20°C ในระยะยาว จากนั้นจึงนำไปทดสอบหาระดับไตเตอร์ของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ด้วยวิธี indirect ELISA (ภาคผนวก) โดยเลือกระดับการเจือจางของแอนติบอดีที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับหรือใกล้เคียงกับ Pre-immune เป็นระดับไตเตอร์ของแอนติบอดี และทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีด้วยวิธี Western blotting analysis โดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ เป็นโปรตีนสำหรับทดสอบ และใช้ horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG ซึ่งถูกเจือจางด้วย blocking buffer เป็นแอนติบอดีทุติยภูมิในอัตราส่วน 1:4,000

บทที่ 5

ผลการทดลอง

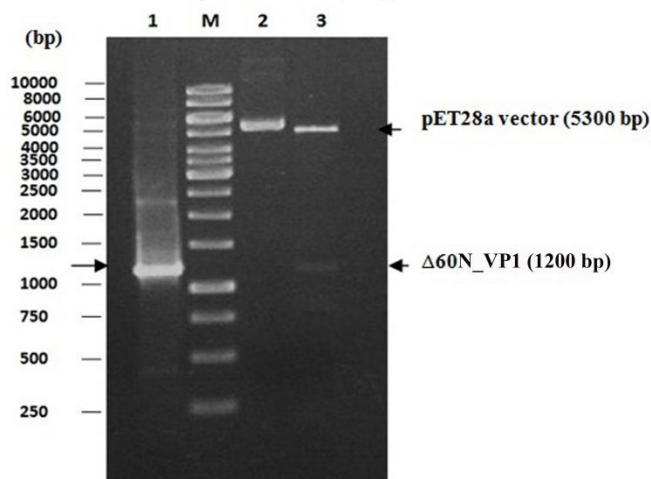
5.1 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของชิ้นยีนที่เกี่ยวข้อง เพื่อใช้ในการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดสำหรับใช้ในการศึกษานี้ จำนวน 5 รูปแบบ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันจากดีเอ็นเอซึ่งสกัดจากอวัยวะม้ามของไก่ติดเชื้อไวรัส CAV โดยอาศัยไพรเมอร์ ดังแสดงในตารางที่ 3.5 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณจะถูกแยกแยะดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า จากนั้นทำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดตามต้องการให้บริสุทธิ์ด้วย Ge/PCR DNA Fragments Extraction Kit แล้วนำไปเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM[®] - T Easy vector เพื่อเก็บรักษาข้อมูลทางพันธุกรรมของยีนที่ใช้ในการศึกษา จากนั้นจึงเคลื่อนย้ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* สายพันธุ์ DH5 α ตามลำดับ เซลล์เจ้าบ้านที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ต้องการหรือรีคอมบิแนนท์โคลนที่สามารถเจริญได้และมีสีขาวขุ่นบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินเป็นตัวคัดเลือกและมีสาร X - Gal กับ IPTG บนผิวหน้าอาหารจะถูกนำมาคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนด้วยวิธี rapid size screening ก่อนนำมาเพิ่มปริมาณรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและสกัดพลาสมิดจากแบคทีเรียด้วยชุดสกัดพลาสมิด High - Speed Plasmid Mini แล้วจึงทำการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเบื้องต้นด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังกล่าวไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อตรวจสอบลำดับความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์และนำไปแปลรหัสเพื่อตรวจสอบลำดับกรดอะมิโนที่ต้องการตามลำดับก่อนนำไปใช้ตัดต่อชิ้นยีนที่ใช้ในการศึกษาเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับการแสดงออกของโปรตีน ชิ้นส่วนของยีนที่ตรวจสอบแล้วว่ามีความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งแปลรหัสให้ลำดับกรดอะมิโนที่ต้องการจะถูกนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม แล้วจึงนำมาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออกของโปรตีน คือ pET28a จากนั้นจึงเคลื่อนย้ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยรีคอมบิแนนท์โคลนที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะแกมมาซินเป็นตัวคัดเลือกจะถูกนำมาคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนด้วยวิธี rapid size screening จากนั้นเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนมาเพิ่มปริมาณรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและสกัดพลาสมิดแล้วนำพลาสมิดมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมเพื่อตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเบื้องต้น จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์อีกครั้งเพื่อตรวจสอบลำดับความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสก่อนนำไปทดสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในขั้นต่อไปซึ่งผลการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแต่ละรูปแบบ มีดังนี้

5.1.1 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดรูปแบบที่ 1 : pET28- Δ 60N_VP1

จากการนำชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Δ 60N_VP1 ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบขนาดของชิ้นยีน Δ 60N_VP1 ประมาณ 1,200 คู่เบส (รูปที่ 5.1, เลน 1) เมื่อโคลนชิ้นยีนดังกล่าวเข้าสู่เวกเตอร์ pGEM[®] - T Easy vector แล้วนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นยีน Δ 60N_VP1 ที่ได้วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นจึงทำการเลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนถูกต้องไปเพิ่มจำนวนในแบคทีเรียและทำการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังกล่าว แล้วจึงนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังกล่าวมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Xho* I แล้วโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออกของโปรตีน pET28a จากนั้นจึงนำรีคอมบิแนนท์โคลนมาสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและตรวจสอบชิ้นยีน Δ 60N_VP1 เบื้องต้นด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Xho* I และวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามลำดับ

จากการทดลองพบว่า รีคอมบิแนนท์พลาสมิดซึ่งมียีน Δ 60N_VP1 (pET28 - Δ 60N_VP1) มีขนาดประมาณ 6,500 คู่เบส (รูปที่ 5.1, เลน 2) และภายหลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Xho* I พบชิ้นดีเอ็นเอของยีน Δ 60N_VP1 มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส ถูกแยกออกจากดีเอ็นเอเวกเตอร์ซึ่งมีขนาดประมาณ 5,300 คู่เบส (รูปที่ 5.1, เลน 3)



รูปที่ 5.1 ผลของการรันอะกาโรสเจล 1% ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Δ 60N_VP1 และผลของการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28- Δ 60N_VP1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Xho* I

- | | |
|-------|--|
| เลน M | ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Ladder (Fermentas, U.S.A) |
| เลน 1 | ชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Δ 60N_VP1 |
| เลน 2 | pET28- Δ 60N_VP1 ไม่ถูกตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Nde</i> I และ <i>Xho</i> I |
| เลน 3 | pET28- Δ 60N_VP1 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Nde</i> I และ <i>Xho</i> I |

และจากการนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ผล ลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังแสดงในรูปที่ 5.2 พบว่า เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 6 และ 22 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP1 ของเชื้อไวรัส Chicken anemia virus ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank (Accession No.DQ124935.1) พบว่ามีความต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 15 และ 17 ตำแหน่ง ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อทำการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 6 และ 22 เป็นจำนวนกรดอะมิโนของโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ และเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน VP1 ของเชื้อไวรัส Chicken anemia virus ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank (Accession No.AAZ40209.1) ดังแสดงในรูปที่ 5.3 พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 6 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของไวรัสทุกตำแหน่ง ในขณะที่ลำดับกรดอะมิโนของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 22 มีลำดับกรดอะมิโนที่ต่างกับลำดับกรดอะมิโนของไวรัส จำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ A279G, Q283H และ W284G



```

*      20      *      40      *      60      *80
dVP1_6 : ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGCTGCCGAACCCCAATC : 80
dVP1_22 : ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGCTGCCGAACCCCAATC : 80
DQ124935.1 : ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGCTGCCGAACCCCAATC : 20
a t g g g c a g c a g c c a t c a t c a t c a t c a c a g c a g c g g c t g g t g c c g c g c g g c a g c c a t a t g c t g c c g a a c c c c a a t c

*      100     *      120     *      140     *      160
dVP1_6 : TACTATGACTATCGCTTCCAAGGAATCATCTTCTCACGGAAGGACTCATTGCTCTAAAAACAGCACAGCGGGGGCT : 160
dVP1_22 : TACTATGACTATCGCTTCCAAGGAATCATCTTCTCACGGAAGGACTCATTGCTCTAAAAACAGCACAGCGGGGGCT : 160
DQ124935.1 : TACTATGACTATCGCTTCCAAGGAATCATCTTCTCACGGAAGGACTCATTGCTCTAAAAACAGCACAGCGGGGGCT : 100
TACTATGACTATCGCTTCCAAGGAATCATCTTCTCACGGAAGGACTCATTGCTCTAAAAACAGCACAGCGGGGGCT

*      180     *      200     *      220     *      240
dVP1_6 : ATGCAGACCCTTGTACGGGGCGAGAGTCGCAAGATCTCCGTGAACCTGAAAGAGTTCCTGCTAGCGTCAATGAACCTG : 240
dVP1_22 : ATGCAGACCCTTGTACGGGGCGAGAGTCGCAAGATCTCCGTGAACCTGAAAGAGTTCCTGCTAGCGTCAATGAACCTG : 240
DQ124935.1 : ATGCAGACCCTTGTACGGGGCGAGAGTCGCAAGATCTCCGTGAACCTGAAAGAGTTCCTGCTAGCGTCAATGAACCTG : 180
ATGCAGACCCTTGTACGGGGCGAGAGTCGCAAGATCTCCGTGAACCTGAAAGAGTTCCTGCTAGCGTCAATGAACCTG

*      260     *      280     *      300     *      320
dVP1_6 : ACATACGTGAGCAAAATCGGAGGCCCATCGCCGGTGAGTTGATTGCGGACGGGTCTCAATCTCAAGCCGCGCAGAAGT : 320
dVP1_22 : ACATACGTGAGCAAAATCGGAGGCCCATCGCCGGTGAGTTGATTGCGGACGGGTCTCAATCTCAAGCCGCGCAGAAGT : 320
DQ124935.1 : ACATACGTGAGCAAAATCGGAGGCCCATCGCCGGTGAGTTGATTGCGGACGGGTCTCAATCTCAAGCCGCGCAGAAGT : 260
ACATACGTGAGCAAAATCGGAGGCCCATCGCCGGTGAGTTGATTGCGGACGGGTCTCAATCTCAAGCCGCGCAGAAGT

*      340     *      360     *      380     *      400
dVP1_6 : GCCTAATTGCTGGCTGCCGCTAGATAATAACGTGCCCTCCGGACACCATCGGCATGGTGGAGATGGGCCTTAATGATGA : 400
dVP1_22 : GCCTAATTGCTGGCTGCCGCTAGATAATAACGTGCCCTCCGGACACCATCGGCATGGTGGAGATGGGCCTTAATGATGA : 400
DQ124935.1 : GCCTAATTGCTGGCTGCCGCTAGATAATAACGTGCCCTCCGGACACCATCGGCATGGTGGAGATGGGCCTTAATGATGA : 340
GCCTAATTGCTGGCTGCCGCTAGATAATAACGTGCCCTCCGGACACCATCGGCATGGTGGAGATGGGCCTTAATGATGA

*      420     *      440     *      460     *      480
dVP1_6 : TGCAGCCCACGGACTCTGCCGGTCTTTAATCACCTAAGCAATGACCTGCAAGACATGGGTCGATGTTGGGGG : 480
dVP1_22 : TGCAGCCCACGGACTCTGCCGGTCTTTAATCACCTAAGCAATGACCTGCAAGACATGGGTCGATGTTGGGGG : 480
DQ124935.1 : TGCAGCCCACGGACTCTGCCGGTCTTTAATCACCTAAGCAATGACCTGCAAGACATGGGTCGATGTTGGGGG : 420
TGCAGCCCACGGACTCTGCCGGTCTTTAATCACCTAAGCAATGACCTGCAAGACATGGGTCGATGTTGGGGG

*      500     *      520     *      540     *      560
dVP1_6 : TGGCACCTGTTCCGACACATGAAACCCGCTTTCAGCTCCTTGCCACTAAGAAATGAGGGATCCTTAGCCCGTGGCGAG : 560
dVP1_22 : TGGCACCTGTTCCGACACATGAAACCCGCTTTCAGCTCCTTGCCACTAAGAAATGAGGGATCCTTAGCCCGTGGCGAG : 560
DQ124935.1 : TGGCACCTGTTCCGACACATGAAACCCGCTTTCAGCTCCTTGCCACTAAGAAATGAGGGATCCTTAGCCCGTGGCGAG : 500
TGGCACCTGTTCCGACACATGAAACCCGCTTTCAGCTCCTTGCCACTAAGAAATGAGGGATCCTTAGCCCGTGGCGAG

*      580     *      600     *      620     *      640
dVP1_6 : TCTTCTCTCCAGGGAGAGTACCTCACGCGTCGGGACGATGTTAAGTACAGCAGCGATCACCAGAACCCGTGGCGAAAAG : 640
dVP1_22 : TCTTCTCTCCAGGGAGAGTACCTCACGCGTCGGGACGATGTTAAGTACAGCAGCGATCACCAGAACCCGTGGCGAAAAG : 640
DQ124935.1 : TCTTCTCTCCAGGGAGAGTACCTCACGCGTCGGGACGATGTTAAGTACAGCAGCGATCACCAGAACCCGTGGCGAAAAG : 580
TCTTCTCTCCAGGGAGAGTACCTCACGCGTCGGGACGATGTTAAGTACAGCAGCGATCACCAGAACCCGTGGCGAAAAG

*      660     *      680     *      700     *      720
dVP1_6 : GCGAACACCGATGACGGGGGATTGCTTATGCGACCGGGAAATGAGACCCGACGAGCAACAGTACCCTGCTATGCC : 720
dVP1_22 : GCGAACACCGATGACGGGGGATTGCTTATGCGACCGGGAAATGAGACCCGACGAGCAACAGTACCCTGCTATGCC : 720
DQ124935.1 : GCGAACACCGATGACGGGGGATTGCTTATGCGACCGGGAAATGAGACCCGACGAGCAACAGTACCCTGCTATGCC : 660
GCGAACACCGATGACGGGGGATTGCTTATGCGACCGGGAAATGAGACCCGACGAGCAACAGTACCCTGCTATGCC

*      740     *      760     *      780     *      800
dVP1_6 : CCAGACCCCCATAATCACCGCTACTACAGCGCAAGGAACGCAAGTCCGCTGCATGAATAGCAGCAGGCTGGTGGTC : 800
dVP1_22 : CCAGACCCCCATAATCACCGCTACTACAGCGCAAGGAACGCAAGTCCGCTGCATGAATAGCAGCAGGCTGGTGGTC : 800
DQ124935.1 : CCAGACCCCCATAATCACCGCTACTACAGCGCAAGGAACGCAAGTCCGCTGCATGAATAGCAGCAGGCTGGTGGTC : 740
CCAGACCCCCATAATCACCGCTACTACAGCGCAAGGAACGCAAGTCCGCTGCATGAATAGCAGCAGGCTGGTGGTC

*      820     *      840     *      860     *      880
dVP1_6 : ATGGGACACATATGAGCTTTGCAACACTCACAGACTCGGTGCACAAGGCTTTTCTCCAGGGCAACGTTCTGTT : 880
dVP1_22 : ATGGGACACATATGAGCTTTGCAACACTCACAGACTCGGTGCACAAGGCTTTTCTCCAGGGCAACGTTCTGTT : 880
DQ124935.1 : ATGGGACACATATGAGCTTTGCAACACTCACAGACTCGGTGCACAAGGCTTTTCTCCAGGGCAACGTTCTGTT : 820
ATGGGACACATATGAGCTTTGCAACACTCACAGACTCGGTGCACAAGGCTTTTCTCCAGGGCAACGTTCTGTT

*      900     *      920     *      940     *      960
dVP1_6 : CTAGACGGTCTTCAACCACCACAAGGCGAGGGAGCGGGGACCCCAAGGGCCAGAGATGGCACAACCTGGTCCGCTG : 960
dVP1_22 : CTAGACGGTCTTCAACCACCACAAGGCGAGGGAGCGGGGACCCCAAGGGCCAGAGATGGCACAACCTGGTCCGCTG : 960
DQ124935.1 : CTAGACGGTCTTCAACCACCACAAGGCGAGGGAGCGGGGACCCCAAGGGCCAGAGATGGCACAACCTGGTCCGCTG : 900
CTAGACGGTCTTCAACCACCACAAGGCGAGGGAGCGGGGACCCCAAGGGCCAGAGATGGCACAACCTGGTCCGCTG

*      980     *      1000    *      1020    *      1040
dVP1_6 : GGCACGGAGACCATCACCGACAGCTACATGAGTGACCGGCTCAGAGCTGGACACTAATTTCTTTACGCTTTACGTAGC : 1040
dVP1_22 : GGCACGGAGACCATCACCGACAGCTACATGAGTGACCGGCTCAGAGCTGGACACTAATTTCTTTACGCTTTACGTAGC : 1040
DQ124935.1 : GGCACGGAGACCATCACCGACAGCTACATGAGTGACCGGCTCAGAGCTGGACACTAATTTCTTTACGCTTTACGTAGC : 980
GGCACGGAGACCATCACCGACAGCTACATGAGTGACCGGCTCAGAGCTGGACACTAATTTCTTTACGCTTTACGTAGC

*      1060    *      1080    *      1100    *      1120
dVP1_6 : GCAAGGCACAAATAAGTCGCAGCAGTACAAGTTCGGCACAGCTACATACCGCTAAAGGAGCCGTAAATGAAGAGCGATG : 1120
dVP1_22 : GCAAGGCACAAATAAGTCGCAGCAGTACAAGTTCGGCACAGCTACATACCGCTAAAGGAGCCGTAAATGAAGAGCGATG : 1120
DQ124935.1 : GCAAGGCACAAATAAGTCGCAGCAGTACAAGTTCGGCACAGCTACATACCGCTAAAGGAGCCGTAAATGAAGAGCGATG : 1060
GCAAGGCACAAATAAGTCGCAGCAGTACAAGTTCGGCACAGCTACATACCGCTAAAGGAGCCGTAAATGAAGAGCGATG

*      1140    *      1160    *      1180    *      1200
dVP1_6 : CATGGGCAGTGGTACGCGTCCAGTCGGTCTGGCAACTGGTAACAGGCAGAGGCCATACCCATGGGACGCTCAACTGGGCC : 1200
dVP1_22 : CATGGGCAGTGGTACGCGTCCAGTCGGTCTGGCAACTGGTAACAGGCAGAGGCCATACCCATGGGACGCTCAACTGGGCC : 1200
DQ124935.1 : CATGGGCAGTGGTACGCGTCCAGTCGGTCTGGCAACTGGTAACAGGCAGAGGCCATACCCATGGGACGCTCAACTGGGCC : 1140
CATGGGCAGTGGTACGCGTCCAGTCGGTCTGGCAACTGGTAACAGGCAGAGGCCATACCCATGGGACGCTCAACTGGGCC

*      1220
dVP1_6 : AACAGCACCATGTAAGTGGGGTTCGACGCCCTGACTCGAG : 1239
dVP1_22 : AACAGCACCATGTAAGTGGGGTTCGACGCCCTGACTCGAG : 1239
DQ124935.1 : AACAGCACCATGTAAGTGGGGTTCGACGCCCTGACTCGAG : 1173
AACAGCACCATGTAAGTGGGGTTCGACGCCCTGACTcgag

```

รูปที่ 5.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Δ60N_VP1 ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pET28a

```

*           20           *           40           *           60           *           80
dVP1_6 : MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLPNPQSTMTIRFQGIIFLTEGLILPKNSTAGGYADHLYGARVAKISVNLKEFLLASMNLT : 81
AAZ40209.1 : -----MLPNPQSTMTIRFQGIIFLTEGLILPKNSTAGGYADHLYGARVAKISVNLKEFLLASMNLT : 61
dVP1_22 : MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLPNPQSTMTIRFQGIIFLTEGLILPKNSTAGGYADHLYGARVAKISVNLKEFLLASMNLT : 81
mgsshhhhhssglvprgshmlpnpqstmtirfqgiiflteglilpknstaggypadhlygarvakisvnlkefllasmnlt

*           100          *           120          *           140          *           160
dVP1_6 : YVSKIGGPIAGELIADGSQSQAQNWPNCWLPDNNVPSATPSAWWRWALMMMQPTDSCRFFNHKQMTLQDMGRMFGGWH : 162
AAZ40209.1 : YVSKIGGPIAGELIADGSQSQAQNWPNCWLPDNNVPSATPSAWWRWALMMMQPTDSCRFFNHKQMTLQDMGRMFGGWH : 142
dVP1_22 : YVSKIGGPIAGELIADGSQSQAQNWPNCWLPDNNVPSATPSAWWRWALMMMQPTDSCRFFNHKQMTLQDMGRMFGGWH : 162
YVSKIGGPIAGELIADGSQSQAQNWPNCWLPDNNVPSATPSAWWRWALMMMQPTDSCRFFNHKQMTLQDMGRMFGGWH

*           180          *           200          *           220          *           240
dVP1_6 : LFRHIETRFQLLATKNEGSFSPVASLLSQGEYLTRRDDVKYSDHQNRWRKGEQPMTGGIAYATGKMRPDEQQYPAMPDPDF : 243
AAZ40209.1 : LFRHIETRFQLLATKNEGSFSPVASLLSQGEYLTRRDDVKYSDHQNRWRKGEQPMTGGIAYATGKMRPDEQQYPAMPDPDF : 223
dVP1_22 : LFRHIETRFQLLATKNEGSFSPVASLLSQGEYLTRRDDVKYSDHQNRWRKGEQPMTGGIAYATGKMRPDEQQYPAMPDPDF : 243
LFRHIETRFQLLATKNEGSFSPVASLLSQGEYLTRRDDVKYSDHQNRWRKGEQPMTGGIAYATGKMRPDEQQYPAMPDPDF

*           260          *           280          *           300          *           320
dVP1_6 : PIITATTAQGTQVRCMNSTQAWWSWDTYMSFATLTLGAQHSFPPGQRSVSRFSFNHKKARGAGDPKQRWHTLVPLGTET : 324
AAZ40209.1 : PIITATTAQGTQVRCMNSTQAWWSWDTYMSFATLTLGAQHSFPPGQRSVSRFSFNHKKARGAGDPKQRWHTLVPLGTET : 304
dVP1_22 : PIITATTAQGTQVRCMNSTQAWWSWDTYMSFATLTLGAQHSFPPGQRSVSRFSFNHKKARGAGDPKQRWHTLVPLGTET : 324
PIITATTAQGTQVRCMNSTQAWWSWDTYMSFATLTLGAQHSFPPGQRSVSRFSFNHKKARGAGDPKQRWHTLVPLGTET

*           340          *           360          *           380          *           400
dVP1_6 : ITDSYMSAPASELDTNFFFLYVAQGTNKSQQYKFGTATYALKPEVMKSDAWAVVRVQSVWQLGNRQRPYPWDVNWANSTMY : 405
AAZ40209.1 : ITDSYMSAPASELDTNFFFLYVAQGTNKSQQYKFGTATYALKPEVMKSDAWAVVRVQSVWQLGNRQRPYPWDVNWANSTMY : 385
dVP1_22 : ITDSYMSAPASELDTNFFFLYVAQGTNKSQQYKFGTATYALKPEVMKSDAWAVVRVQSVWQLGNRQRPYPWDVNWANSTMY : 405
ITDSYMSAPASELDTNFFFLYVAQGTNKSQQYKFGTATYALKPEVMKSDAWAVVRVQSVWQLGNRQRPYPWDVNWANSTMY

*
dVP1_6 : WGSQP-IE : 412
AAZ40209.1 : WGSQP--- : 390
dVP1_22 : WGSQP-IE : 412
WGSQP le

```

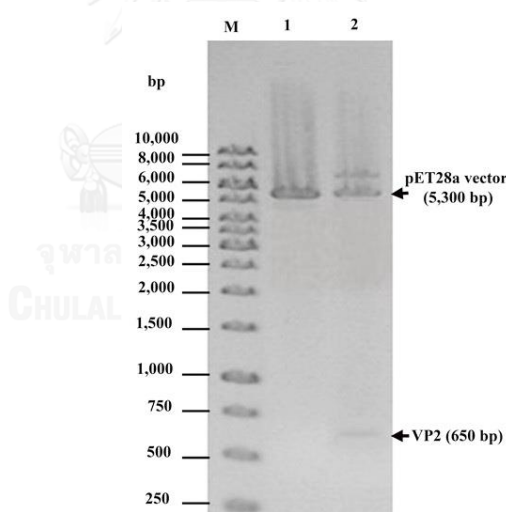
รูปที่ 5.3 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน $\Delta 60N_VP1$ ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pET28a

จากผลการทดลองนี้ จึงสรุปว่า รีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 6 ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน VP1 ของไวรัสในทุกตำแหน่ง เหมาะสมในการเลือกนำไปใช้ในการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ในขั้นต่อไป

5.1.2 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดรูปแบบที่ 2 : pET28 –VP2

จากการนำชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน VP2 ไปทำการโคลนชิ้นยีนดังกล่าวเข้าสู่เวกเตอร์ pGEM[®] - T Easy vector แล้วนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นยีน VP2 ที่ได้วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นจึงทำการเลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนถูกต้องไปเพิ่มจำนวนในแบคทีเรียและทำการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังกล่าวแล้วจึงนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Xho* I แล้วโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออกของโปรตีน pET28a จากนั้นจึงนำรีคอมบิแนนท์โคลนมาสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและตรวจสอบชิ้นยีน VP2 เบื้องต้นด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Xho* I และวิเคราะห์ด้วยวิธีวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตามลำดับ

จากการทดลองพบว่า รีคอมบิแนนท์พลาสมิดซึ่งมียีน VP2 (pET28 – VP2) มีขนาดประมาณ 6,000 คู่เบส (รูปที่ 5.4, เลน 1) และภายหลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Xho* I พบชิ้นดีเอ็นเอของยีน Δ 60N_VP1 มีขนาดประมาณ 650 คู่เบส ถูกแยกออกจากดีเอ็นเอเวกเตอร์ซึ่งมีขนาดประมาณ 5,300 คู่เบส (รูปที่ 5.4, เลน 2)



รูปที่ 5.4 ผลของการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28–VP2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Xho* I

เลน M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Ladder (Promega, USA)

เลน 1 pET28–VP2 ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะใดๆ

เลน 2 pET28–VP2 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Xho* I

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 5, 50 และ 54 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP2 ของเชื้อไวรัส Chicken anemia virus ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank (Accession No.DQ124935.1) พบว่ามีความต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวนทั้งสิ้น 5, 3 และ 3 ตำแหน่ง ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 5.5

```

*           20           *           40           *           60           *           80
VP2_50      : ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCAAGCAGCAGCGGCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGCACGGGAACGGCGGACAA : 81
VP2_5       : ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCAAGCAGCAGCGGCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGCACGGGAACGGCGGACAA : 81
VP2_54      : ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCAAGCAGCAGCGGCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGCACGGGAACGGCGGACAA : 81
DQ124935.1 : -----ATGCACGGGAACGGCGGACAA : 21
atgggcagcagccatcatcatcatcatcaagcagcagcgctgggtgcccgcgcggcagccatATGCACGGGAACGGCGGACAA

*           100          *           120          *           140          *           160
VP2_50      : CCGGCGCTGGGGCAGTGAATCGGCCTTAGCCGAGAGGGGCAACCTGGGCCAGCGGAGCCGCGCAGGGGCAAGTAAATT : 162
VP2_5       : CCGGCGCTGGGGCAGTGAATCGGCCTTAGCCGAGAGGGGCAACCTGGGCCAGCGGAGCCGCGCAGGGGCAAGTAAATT : 162
VP2_54      : CCGGCGCTGGGGCAGTGAATCGGCCTTAGCCGAGAGGGGCAACCTGGGCCAGCGGAGCCGCGCAGGGGCAAGTAAATT : 162
DQ124935.1 : CCGGCGCTGGGGCAGTGAATCGGCCTTAGCCGAGAGGGGCAACCTGGGCCAGCGGAGCCGCGCAGGGGCAAGTAAATT : 102
CCGGCGCTGGGGCAGTGAATCGGCCTTAGCCGAGAGGGGCAACCTGGGCCAGCGGAGCCGCGCAGGGGCAAGTAAATT

*           180          *           200          *           220          *           240
VP2_50      : TCAAATGAACGCTCTCCAAGAAGATACTCCACCCGGACCATCAACGGTGTTGAGGCCACCAACAAGTTCACGGCCGTCGGA : 243
VP2_5       : TCAAATGAACGCTCTCCAAGAAGATACTCCACCCGGACCATCAACGGTGTTGAGGCCACCAACAAGTTCACGGCCGTCGGA : 243
VP2_54      : TCAAATGAACGCTCTCCAAGAAGATACTCCACCCGGACCATCAACGGTGTTGAGGCCACCAACAAGTTCACGGCCGTCGGA : 243
DQ124935.1 : TCAAATGAACGCTCTCCAAGAAGATACTCCACCCGGACCATCAACGGTGTTGAGGCCACCAACAAGTTCACGGCCGTCGGA : 183
TCAAATGAACGCTCTCCAAGAAGATACTCCACCCGGACCATCAACGGTGTTGAGGCCACCAACAAGTTCACGGCCGTCGGA

*           260          *           280          *           300          *           320
VP2_50      : AACCCCTCACTGCAGAGAGATCCGGATTGGTATCGCTGGAATTACAATCACTCTATCGCTGTGTGGCTGCGCGAATGCTCG : 324
VP2_5       : AACCCCTCACTGCAGAGAGATCCGGATTGGTATCGCTGGAATTACAATCACTCTATCGCTGTGTGGCTGCGCGAATGCTCG : 324
VP2_54      : AACCCCTCACTGCAGAGAGATCCGGATTGGTATCGCTGGAATTACAATCACTCTATCGCTGTGTGGCTGCGCGAATGCTCG : 324
DQ124935.1 : AACCCCTCACTGCAGAGAGATCCGGATTGGTATCGCTGGAATTACAATCACTCTATCGCTGTGTGGCTGCGCGAATGCTCG : 264
AACCCCTCACTGCAGAGAGATCCGGATTGGTATCGCTGGAATTACAATCACTCTATCGCTGTGTGGCTGCGCGAATGCTCG

*           340          *           360          *           380          *           400
VP2_50      : CGTCCCACGCTAAGATCTGCAACTGCGGACAATTGAGAAAGCACTGGTTTCAAGAATGTGCCGACTTGAGGACCGGATCA : 405
VP2_5       : CGTCCCACGCTAAGATCTGCAACTGCGGACAATTGAGAAAGCACTGGTTTCAAGAATGTGCCGACTTGAGGACCGGATCA : 405
VP2_54      : CGTCCCACGCTAAGATCTGCAACTGCGGACAATTGAGAAAGCACTGGTTTCAAGAATGTGCCGACTTGAGGACCGGATCA : 405
DQ124935.1 : CGTCCCACGCTAAGATCTGCAACTGCGGACAATTGAGAAAGCACTGGTTTCAAGAATGTGCCGACTTGAGGACCGGATCA : 345
CGGTCCCACGCTAAGATCTGCAACTGCGGACAATTGAGAAAGCACTGGTTTCAAGAATGTGCCGACTTGAGGACCGGATCA

*           420          *           440          *           460          *           480
VP2_50      : ACCCAAGCCTCCCTCGAAGAAGCGATCCTGCGACCCCTCCGAGTACAGGGTAAGCGAGCTAAAAGAAAGCTTGATTACCA : 486
VP2_5       : ACCCAAGCCTCCCTCGAAGAAGCGATCCTGCGACCCCTCCGAGTACAGGGTAAGCGAGCTAAAAGAAAGCTTGATTACCA : 486
VP2_54      : ACCCAAGCCTCCCTCGAAGAAGCGATCCTGCGACCCCTCCGAGTACAGGGTAAGCGAGCTAAAAGAAAGCTTGATTACCA : 486
DQ124935.1 : ACCCAAGCCTCCCTCGAAGAAGCGATCCTGCGACCCCTCCGAGTACAGGGTAAGCGAGCTAAAAGAAAGCTTGATTACCA : 426
ACCCAAGCCTCCCTCGAAGAAGCGATCCTGCGACCCCTCCGAGTACAGGGTAAGCGAGCTAAAAGAAAGCTTGATTACCA

*           500          *           520          *           540          *           560
VP2_50      : TACTCCAGCCGACCCGAAACCGCAAGAAGGTGATAAGACTGTAAGATGGCAAGACGAGCTCGCAGACCGAGAGGCCGAT : 567
VP2_5       : TACTCCAGCCGACCCGAAACCGCAAGAAGGTGATAAGACTGTAAGATGGCAAGACGAGCTCGCAGACCGAGAGGCCGAT : 567
VP2_54      : TACTCCAGCCGACCCGAAACCGCAAGAAGGTGATAAGACTGTAAGATGGCAAGACGAGCTCGCAGACCGAGAGGCCGAT : 567
DQ124935.1 : TACTCCAGCCGACCCGAAACCGCAAGAAGGTGATAAGACTGTAAGATGGCAAGACGAGCTCGCAGACCGAGAGGCCGAT : 507
TACTCCAGCCGACCCGAAACCGCAAGAAGGTGATAAGACTGTAAGATGGCAAGACGAGCTCGCAGACCGAGAGGCCGAT

*           580          *           600          *           620          *           640
VP2_50      : TTTACGCCTTCAGAAGAGGACGGTGGCACCACCTCAAGCGACTTCGACGAAGATATAAATTTTCGACATCGGAGGAGACAG : 648
VP2_5       : TTTACGCCTTCAGAAGAGGACGGTGGCACCACCTCAAGCGACTTCGACGAAGATATAAATTTTCGACATCGGAGGAGACAG : 648
VP2_54      : TTTACGCCTTCAGAAGAGGACGGTGGCACCACCTCAAGCGACTTCGACGAAGATATAAATTTTCGACATCGGAGGAGACAG : 648
DQ124935.1 : TTTACGCCTTCAGAAGAGGACGGTGGCACCACCTCAAGCGACTTCGACGAAGATATAAATTTTCGACATCGGAGGAGACAG : 588
TTTACGCCTTCAGAAGAGGACGGTGGCACCACCTCAAGCGACTTCGACGAAGATATAAATTTTCGACATCGGAGGAGACAG

*           660          *           680          *           700          *
VP2_50      : GGTATCGTAGACGAGCTTTTAGGAAGGCCTTTCAACCCCGCCCGGTACGTATAGTGTGACTCGAG : 717
VP2_5       : GGTATCGTAGACGAGCTTTTAGGAAGGCCTTTCAACCCCGCCCGGTACGTATAGTGTGACTCGAG : 717
VP2_54      : GGTATCGTAGACGAGCTTTTAGGAAGGCCTTTCAACCCCGCCCGGTACGTATAGTGTGACTCGAG : 717
DQ124935.1 : GGTATCGTAGACGAGCTTTTAGGAAGGCCTTTCAACCCCGCCCGGTACGTATAGTGTGACTCGAG : 651
GGTATCGTAGACGAGCTTTTAGGAAGGCCTTTcaCAACCCCGCCCGGTACGTATAGTGTGActcgag

```

รูปที่ 5.5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP2 ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pET28a

อย่างไรก็ตามเมื่อทำการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลน ทั้ง 3 โคลนเป็นกรดอะมิโนของโปรตีน VP2 และเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน VP2 ของเชื้อไวรัส Chicken anemia virus ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank (Accession No.AA40207.1) ดังแสดงในรูปที่ 5.6 พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 50 และ 54 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของไวรัสทุกตำแหน่ง ในขณะที่ลำดับกรดอะมิโนของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 5 มีลำดับกรดอะมิโนที่ต่างกับลำดับกรดอะมิโนของไวรัสเพียงตำแหน่งเดียว คือ T229A

```

*           20           *           40           *           60           *           80
VP2_50      : MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMHGNGGQPAAGGSESALSREGQPGPSGAAQGVISNERSPRRYSTRTINGVQATNKFTAVGNP : 83
VP2_5      : MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMHGNGGQPAAGGSESALSREGQPGPSGAAQGVISNERSPRRYSTRTINGVQATNKFTAVGNP : 83
VP2_54     : MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMHGNGGQPAAGGSESALSREGQPGPSGAAQGVISNERSPRRYSTRTINGVQATNKFTAVGNP : 83
AAZ40207.1 : -----MHGNGGQPAAGGSESALSREGQPGPSGAAQGVISNERSPRRYSTRTINGVQATNKFTAVGNP : 63
mgsshhhhhsqlvprgshMHGNGGQPAAGGSESALSREGQPGPSGAAQGVISNERSPRRYSTRTINGVQATNKFTAVGNP

*           100          *           120          *           140          *           160
VP2_50      : SLQRDPDWYRWNYNHSIAVWLRCSRSYAKICNCGQFRKHWFQECAGLEDRSTQASLEEAAILRPLRVQVKRAKRLDYHYSQP : 166
VP2_5      : SLQRDPDWYRWNYNHSIAVWLRCSRSYAKICNCGQFRKHWFQECAGLEDRSTQASLEEAAILRPLRVQVKRAKRLDYHYSQP : 166
VP2_54     : SLQRDPDWYRWNYNHSIAVWLRCSRSYAKICNCGQFRKHWFQECAGLEDRSTQASLEEAAILRPLRVQVKRAKRLDYHYSQP : 166
AAZ40207.1 : SLQRDPDWYRWNYNHSIAVWLRCSRSYAKICNCGQFRKHWFQECAGLEDRSTQASLEEAAILRPLRVQVKRAKRLDYHYSQP : 146
SLQRDPDWYRWNYNHSIAVWLRCSRSYAKICNCGQFRKHWFQECAGLEDRSTQASLEEAAILRPLRVQVKRAKRLDYHYSQP

*           180          *           200          *           220          *
VP2_50      : TPNRKKVYKTVRWQDELADREADFTPSEEDGGTSSDFDEDINFDIGGDSGIVDELLGRPFITPAPVRIVLE : 238
VP2_5      : TPNRKKVYKTVRWQDELADREADFTPSEEDGGTSSDFDEDINFDIGGDSGIVDELLGRPFITPAPVRIVLE : 238
VP2_54     : TPNRKKVYKTVRWQDELADREADFTPSEEDGGTSSDFDEDINFDIGGDSGIVDELLGRPFITPAPVRIVLE : 238
AAZ40207.1 : TPNRKKVYKTVRWQDELADREADFTPSEEDGGTSSDFDEDINFDIGGDSGIVDELLGRPFITPAPVRIV--- : 216
TPNRKKVYKTVRWQDELADREADFTPSEEDGGTSSDFDEDINFDIGGDSGIVDELLGRPFITPAPVRIV 1e

```

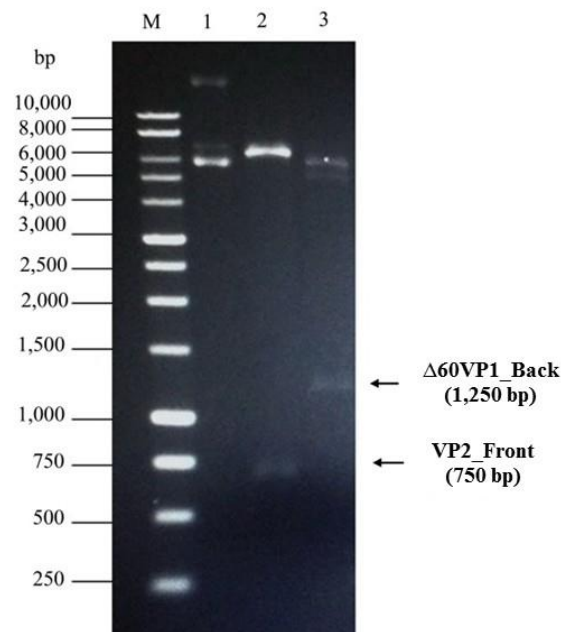
รูปที่ 5.6 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP2 ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pET28a

จากผลการทดลองนี้ จึงสรุปว่า รีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 50 และ 54 ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน VP2 ของไวรัสในทุกตำแหน่ง เหมาะสมในการเลือกนำไปใช้ในการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 ในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 50 ด้วยวิธีการเลือกแบบสุ่มสำหรับนำไปใช้ในการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในขั้นต่อไป

5.1.3 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดรูปแบบที่ 3 : pET28-VP2/ Δ 60N_VP1

จากการนำชิ้นยีน VP2_Front และชิ้นยีน Δ 60N_VP1_Back โคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pGEM[®] - T Easy vector แล้วนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นยีน VP2_Front และยีน Δ 60N_VP1_Back ที่ได้วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นจึงทำการเลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนถูกต้องไปเพิ่มจำนวนในแบคทีเรีย และทำการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังกล่าว จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นยีน VP2_Front (pGEM T-VP2_Front) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Eco* RI แล้วโคลนชิ้นยีน VP2_Front เข้าสู่เวกเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออกของโปรตีน pET28a จากนั้นจึงนำรีคอมบิแนนท์โคลนมาสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและตรวจสอบชิ้นยีน VP2_Front เบื้องต้นด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Eco* RI แล้วจึงนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นยีน VP2_Front (pET28-VP2_Front) ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นทำการเลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ถูกต้องไปเพิ่มจำนวนในแบคทีเรียและทำการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังกล่าว ในขณะเดียวกันได้นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน Δ 60N_VP1_Back (pGEM T- Δ 60N_VP1_Back) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Xho* I แล้วจึงทำการเชื่อมต่อชิ้นยีน Δ 60N_VP1_Back เข้ากับชิ้นดีเอ็นเอเวกเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออกของโปรตีน pET28_VP2_Front ที่ได้ข้างต้น ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Xho* I เช่นเดียวกัน จากนั้นจึงคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดซึ่งมีชิ้นยีน VP2_Front เชื่อมต่อกับชิ้นยีน Δ 60N_VP1_Back (pET28-VP2/ Δ 60N_VP1) มาสกัดพลาสมิดและตรวจสอบว่ามีชิ้นยีน VP2/ Δ 60N_VP1 เบื้องต้นด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

จากการทดลองพบว่ารีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a-VP2/ Δ 60N_VP1 มีขนาดประมาณ 7,250 คู่เบส (รูปที่ 5.7, เลน 1) และภายหลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Eco* RI พบชิ้นดีเอ็นเอของยีน VP2_Front มีขนาดประมาณ 750 คู่เบส ถูกแยกออกจากดีเอ็นเอเวคเตอร์ซึ่งมีขนาดประมาณ 6,550 คู่เบส (รูปที่ 5.7, เลน 2) ในขณะที่เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Xho* I พบชิ้นดีเอ็นเอของยีน Δ 60N_VP1_Back มีขนาดประมาณ 1,250 คู่เบส ถูกแยกออกจากดีเอ็นเอเวคเตอร์ซึ่งมีขนาดประมาณ 6,050 คู่เบส (รูปที่ 5.7, เลน 3)



รูปที่ 5.7 ผลของการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28-VP2/ Δ 60N_VP1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างๆ

เลน M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Ladder (Promega, USA)

เลน 1 pET28-VP2/ Δ 60N_VP1 ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะใดๆ

เลน 2 pET28-VP2/ Δ 60N_VP1 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Eco* RI

เลน 3 pET28-VP2/ Δ 60N_VP1 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Xho* I

จากการนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังแสดงในรูปที่ 5.8 พบว่า เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 8, 9 และ 10 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP1 และ VP2 ของเชื้อไวรัส Chicken anemia virus ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank (Accession No.AF311900.3) พบว่ามีความต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวนทั้งสิ้น 19, 21 และ 19 ตำแหน่ง ตามลำดับ

clone9	:	ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCAAGCAGCGGGCTGGTCCCGCGGGCAGCCATATGGGGCCCGGGCTGGTTCC	:	80
clone10	:	ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCAAGCAGCGGGCTGGTCCCGCGGGCAGCCATATGGGGCCCGGGCTGGTTCC	:	80
clone8	:	ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCAAGCAGCGGGCTGGTCCCGCGGGCAGCCATATGGGGCCCGGGCTGGTTCC	:	80
AF311900.3	:	-----	:	-
		atgggcagcagccatcatcatcatcatcaagcagcggcctgggtcccgcgggcagccatattggggcccgggctggttcc		
clone9	:	CGCTGGCTCATGACAGGGAAACGGCGGACAAACCGGCGCTGGGGCAGTGAATCGGCGCTAGCCGAGAGGGGCAACTG	:	160
clone10	:	CGCTGGCTCATGACAGGGAAACGGCGGACAAACCGGCGCTGGGGCAGTGAATCGGCGCTAGCCGAGAGGGGCAACTG	:	160
clone8	:	CGCTGGCTCATGACAGGGAAACGGCGGACAAACCGGCGCTGGGGCAGTGAATCGGCGCTAGCCGAGAGGGGCAACTG	:	160
AF311900.3	:	-----	:	170
		gctgtgctctATGACAGGGAAACGGCGGACAAACCGGCGCTGGGGCAGTGAATCGGCGCTAGCCGAGAGGGGCAACTG		
clone9	:	GGCCAGCGGAGCCGCGCAGGGCAAGTAATTTCAAATGAACGCTCTCCAAGAAGATACTCCACCCGGACCATCAACGGT	:	240
clone10	:	GGCCAGCGGAGCCGCGCAGGGCAAGTAATTTCAAATGAACGCTCTCCAAGAAGATACTCCACCCGGACCATCAACGGT	:	240
clone8	:	GGCCAGCGGAGCCGCGCAGGGCAAGTAATTTCAAATGAACGCTCTCCAAGAAGATACTCCACCCGGACCATCAACGGT	:	240
AF311900.3	:	-----	:	150
		GGCCAGCGGAGCCGCGCAGGGCAAGTAATTTCAAATGAACGCTCTCCAAGAAGATACTCCACCCGGACCATCAACGGT		
clone9	:	GTTCAGGCCACCAACAAGTTACGCGCCGTGGAAACCCCTCACTGCAGAGAGATCCGGATTGGTATCGCTGGAATTACAA	:	320
clone10	:	GTTCAGGCCACCAACAAGTTACGCGCCGTGGAAACCCCTCACTGCAGAGAGATCCGGATTGGTATCGCTGGAATTACAA	:	320
clone8	:	GTTCAGGCCACCAACAAGTTACGCGCCGTGGAAACCCCTCACTGCAGAGAGATCCGGATTGGTATCGCTGGAATTACAA	:	320
AF311900.3	:	-----	:	230
		GTTCAGGCCACCAACAAGTTACGCGCCGTGGAAACCCCTCACTGCAGAGAGATCCGGATTGGTATCGCTGGAATTACAA		
clone9	:	TCACTCTATCGCTGTGTGGCTGCCGAATGCTCGCGTCCACCGCTAAGATCTGCAACTGCGGACAATTCAGAAAGCACT	:	400
clone10	:	TCACTCTATCGCTGTGTGGCTGCCGAATGCTCGCGTCCACCGCTAAGATCTGCAACTGCGGACAATTCAGAAAGCACT	:	400
clone8	:	TCACTCTATCGCTGTGTGGCTGCCGAATGCTCGCGTCCACCGCTAAGATCTGCAACTGCGGACAATTCAGAAAGCACT	:	400
AF311900.3	:	-----	:	310
		TCACTCTATCGCTGTGTGGCTGCCGAATGCTCGCGTCCACCGCTAAGATCTGCAACTGCGGACAATTCAGAAAGCACT		
clone9	:	GGTTTCAAGAATGTGCCGGACTTGAGGACCGATCAACCCAAAGCCTCCCTCGAAGAAGCGATCCTGCGACCCCTCCGAGTA	:	480
clone10	:	GGTTTCAAGAATGTGCCGGACTTGAGGACCGATCAACCCAAAGCCTCCCTCGAAGAAGCGATCCTGCGACCCCTCCGAGTA	:	480
clone8	:	GGTTTCAAGAATGTGCCGGACTTGAGGACCGATCAACCCAAAGCCTCCCTCGAAGAAGCGATCCTGCGACCCCTCCGAGTA	:	480
AF311900.3	:	-----	:	390
		GGTTTCAAGAATGTGCCGGACTTGAGGACCGATCAACCCAAAGCCTCCCTCGAAGAAGCGATCCTGCGACCCCTCCGAGTA		
clone9	:	CAGGGTAAGCGAGCTAAAAGAAAGCTTGAATTACCCTACTCCAGCCGACCCCGAAACCGCAAGAAGGTTGATAAAGACTGT	:	560
clone10	:	CAGGGTAAGCGAGCTAAAAGAAAGCTTGAATTACCCTACTCCAGCCGACCCCGAAACCGCAAGAAGGTTGATAAAGACTGT	:	560
clone8	:	CAGGGTAAGCGAGCTAAAAGAAAGCTTGAATTACCCTACTCCAGCCGACCCCGAAACCGCAAGAAGGTTGATAAAGACTGT	:	560
AF311900.3	:	-----	:	470
		CAGGGTAAGCGAGCTAAAAGAAAGCTTGAATTACCCTACTCCAGCCGACCCCGAAACCGCAAGAAGGTTGATAAAGACTGT		
clone9	:	AAGATGGCAAGACGAGCTCGCAGACCGAGAGGGCCGATTTACGCCTTCAGAAGAGGACGGTGGCACCACTCAAGCGACT	:	640
clone10	:	AAGATGGCAAGACGAGCTCGCAGACCGAGAGGGCCGATTTACGCCTTCAGAAGAGGACGGTGGCACCACTCAAGCGACT	:	640
clone8	:	AAGATGGCAAGACGAGCTCGCAGACCGAGAGGGCCGATTTACGCCTTCAGAAGAGGACGGTGGCACCACTCAAGCGACT	:	640
AF311900.3	:	-----	:	550
		AAGATGGCAAGACGAGCTCGCAGACCGAGAGGGCCGATTTACGCCTTCAGAAGAGGACGGTGGCACCACTCAAGCGACT		
clone9	:	TCGACGAAGATATAAATTTGCACATCGGAGGAGACAGCGGATTCGTAGACGAGCTTTTAGGAAGGCCTTTCAACAACCCG	:	720
clone10	:	TCGACGAAGATATAAATTTGCACATCGGAGGAGACAGCGGATTCGTAGACGAGCTTTTAGGAAGGCCTTTCAACAACCCG	:	720
clone8	:	TCGACGAAGATATAAATTTGCACATCGGAGGAGACAGCGGATTCGTAGACGAGCTTTTAGGAAGGCCTTTCAACAACCCG	:	720
AF311900.3	:	-----	:	630
		TCGACGAAGATATAAATTTGCACATCGGAGGAGACAGCGGATTCGTAGACGAGCTTTTAGGAAGGCCTTTCAACAACCCG		
clone9	:	GCCCCGGTACGTATAGTGGGTGAATTCGATTAATGATATCCCGACCGAGAACCTGTACTTCCAAGGCCTGCCGAACCC	:	800
clone10	:	GCCCCGGTACGTATAGTGGGTGAATTCGATTAATGATATCCCGACCGAGAACCTGTACTTCCAAGGCCTGCCGAACCC	:	800
clone8	:	GCCCCGGTACGTATAGTGGGTGAATTCGATTAATGATATCCCGACCGAGAACCTGTACTTCCAAGGCCTGCCGAACCC	:	800
AF311900.3	:	-----	:	710
		GCCCCGGTACGTATAGTGGGTGAATTCGATTAATGATATCCCGACCGAGAACCTGTACTTCCAAGGCCTGCCGAACCC		
clone9	:	CCAATCTACTATGACTATCGCTTCCAAGGAATCATCTTTCTCACGGAAGGACTCATTTGGCTAAAAACAGCACAGCGG	:	880
clone10	:	CCAATCTACTATGACTATCGCTTCCAAGGAATCATCTTTCTCACGGAAGGACTCATTTGGCTAAAAACAGCACAGCGG	:	880
clone8	:	CCAATCTACTATGACTATCGCTTCCAAGGAATCATCTTTCTCACGGAAGGACTCATTTGGCTAAAAACAGCACAGCGG	:	880
AF311900.3	:	-----	:	790
		CCAATCTACTATGACTATCGCTTCCAAGGAATCATCTTTCTCACGGAAGGACTCATTTGGCTAAAAACAGCACAGCGG		

รูปที่ 5.8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP2/ Δ 60N_VP1 ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pET28a

```

clone9 : GGGGCTATGCAGACCACCTTTGACGGGGCGAGAGTCGCAAGATCTCCGTGAACCTGAAAGAGTTCCTGCTAGCGTCAATG : 960
clone10 : GGGGCTATGCAGACCACCTTTGACGGGGCGAGAGTCGCAAGATCTCCGTGAACCTGAAAGAGTTCCTGCTAGCGTCAATG : 960
clone8 : GGGGCTATGCAGACCACCTTTGACGGGGCGAGAGTCGCAAGATCTCCGTGAACCTGAAAGAGTTCCTGCTAGCGTCAATG : 960
AF311900.3 : GGGGCTATGCAGACCACCTTTGACGGGGCGAGAGTCGCAAGATCTCCGTGAACCTGAAAGAGTTCCTGCTAGCGTCAATG : 870
GGGGCTATGCAGACCACCTTTGACGGGGCGAGAGTCGCAAGATCTCCGTGAACCTGAAAGAGTTCCTGCTAGCGTCAATG

clone9 : AACCTGACATACGTGAGCAAATCGGAGGCCCATCGCCGGTGAGTTGATTGCGGACGGGTCTCAATCTCAAGCCGCGCA : 1040
clone10 : AACCTGACATACGTGAGCAAATCGGAGGCCCATCGCCGGTGAGTTGATTGCGGACGGGTCTCAATCTCAAGCCGCGCA : 1040
clone8 : AACCTGACATACGTGAGCAAATCGGAGGCCCATCGCCGGTGAGTTGATTGCGGACGGGTCTCAATCTCAAGCCGCGCA : 1040
AF311900.3 : AACCTGACATACGTGAGCAAATCGGAGGCCCATCGCCGGTGAGTTGATTGCGGACGGGTCTCAATCTCAAGCCGCGCA : 950
AACCTGACATACGTGAGCAAATCGGAGGCCCATCGCCGGTGAGTTGATTGCGGACGGGTCTCAATCTCAAGCCGCGCA

clone9 : GAACTGGCCTAATTGCTGGCTGCCGCTAGATAATAACGTGCCCTCCGGACACCATCGGCATGGTGGAGATGGGCCCTTAA : 1120
clone10 : GAACTGGCCTAATTGCTGGCTGCCGCTAGATAATAACGTGCCCTCCGGACACCATCGGCATGGTGGAGATGGGCCCTTAA : 1120
clone8 : GAACTGGCCTAATTGCTGGCTGCCGCTAGATAATAACGTGCCCTCCGGACACCATCGGCATGGTGGAGATGGGCCCTTAA : 1120
AF311900.3 : GAACTGGCCTAATTGCTGGCTGCCGCTAGATAATAACGTGCCCTCCGGACACCATCGGCATGGTGGAGATGGGCCCTTAA : 1030
GAACTGGCCTAATTGCTGGCTGCCGCTAGATAATAACGTGCCCTCCGGACACCATCGGCATGGTGGAGATGGGCCCTTAA

clone9 : TGATGATGCAGCCACGGACTCTTGCCGGTTCTTTAATCACCTAAGCAATGACCTGCAAGACATGGGTCGCATGTTT : 1200
clone10 : TGATGATGCAGCCACGGACTCTTGCCGGTTCTTTAATCACCTAAGCAATGACCTGCAAGACATGGGTCGCATGTTT : 1200
clone8 : TGATGATGCAGCCACGGACTCTTGCCGGTTCTTTAATCACCTAAGCAATGACCTGCAAGACATGGGTCGCATGTTT : 1200
AF311900.3 : TGATGATGCAGCCACGGACTCTTGCCGGTTCTTTAATCACCTAAGCAATGACCTGCAAGACATGGGTCGCATGTTT : 1110
TGATGATGCAGCCACGGACTCTTGCCGGTTCTTTAATCACCTAAGCAATGACCTGCAAGACATGGGTCGCATGTTT

clone9 : GGGGGCTGGCACCTGTTCCGACACATTGA AACCCGCTTTCAGCTCCTTGCCACTAAGAAATGAGGGATCCTTTAGCCCGGT : 1280
clone10 : GGGGGCTGGCACCTGTTCCGACACATTGA AACCCGCTTTCAGCTCCTTGCCACTAAGAAATGAGGGATCCTTTAGCCCGGT : 1280
clone8 : GGGGGCTGGCACCTGTTCCGACACATTGA AACCCGCTTTCAGCTCCTTGCCACTAAGAAATGAGGGATCCTTTAGCCCGGT : 1280
AF311900.3 : GGGGGCTGGCACCTGTTCCGACACATTGA AACCCGCTTTCAGCTCCTTGCCACTAAGAAATGAGGGATCCTTTAGCCCGGT : 1190
GGGGCTGGCACCTGTTCCGACACATTGA AACCCGCTTTCAGCTCCTTGCCACTAAGAAATGAGGGATCCTTTAGCCCGGT

clone9 : GCGGAGTCTTCTCTCCAGGGAGAGTACCTCACCGCTCGGGACGATGTTAAGTACAGCAGCGATCACCAGAACCGGTGGC : 1360
clone10 : GCGGAGTCTTCTCTCCAGGGAGAGTACCTCACCGCTCGGGACGATGTTAAGTACAGCAGCGATCACCAGAACCGGTGGC : 1360
clone8 : GCGGAGTCTTCTCTCCAGGGAGAGTACCTCACCGCTCGGGACGATGTTAAGTACAGCAGCGATCACCAGAACCGGTGGC : 1360
AF311900.3 : GCGGAGTCTTCTCTCCAGGGAGAGTACCTCACCGCTCGGGACGATGTTAAGTACAGCAGCGATCACCAGAACCGGTGGC : 1270
GCGGAGTCTTCTCTCCAGGGAGAGTACCTCACCGCTCGGGACGATGTTAAGTACAGCAGCGATCACCAGAACCGGTGGC

clone9 : GAAAAGGGCAACAACCGATGACGGGGGTATTGCTTATGCGACCGGGAAATGAGACCCGACGAGCAACAGTACCCTGCT : 1440
clone10 : GAAAAGGGCAACAACCGATGACGGGGGTATTGCTTATGCGACCGGGAAATGAGACCCGACGAGCAACAGTACCCTGCT : 1440
clone8 : GAAAAGGGCAACAACCGATGACGGGGGTATTGCTTATGCGACCGGGAAATGAGACCCGACGAGCAACAGTACCCTGCT : 1440
AF311900.3 : GAAAAGGGCAACAACCGATGACGGGGGTATTGCTTATGCGACCGGGAAATGAGACCCGACGAGCAACAGTACCCTGCT : 1350
GAAAAGGGCAACAACCGATGACGGGGGTATTGCTTATGCGACCGGGAAATGAGACCCGACGAGCAACAGTACCCTGCT

clone9 : ATGCCCCAGACCCCCCAATAATCACCGTACTACAGCGCAAGGAACGCAAGTCCGCTGCATGAATAGCACGCAAGCTGTG : 1520
clone10 : ATGCCCCAGACCCCCCAATAATCACCGTACTACAGCGCAAGGAACGCAAGTCCGCTGCATGAATAGCACGCAAGCTGTG : 1520
clone8 : ATGCCCCAGACCCCCCAATAATCACCGTACTACAGCGCAAGGAACGCAAGTCCGCTGCATGAATAGCACGCAAGCTGTG : 1520
AF311900.3 : ATGCCCCAGACCCCCCAATAATCACCGTACTACAGCGCAAGGAACGCAAGTCCGCTGCATGAATAGCACGCAAGCTGTG : 1430
ATGCCCCAGACCCCCCAATAATCACCGTACTACAGCGCAAGGAACGCAAGTCCGCTGCATGAATAGCACGCAAGCTGTG

clone9 : GTGGTCATGGGACACATATATGAGCTTTGCAACACTCACAGCACTCGGTGCACAATGGTCTTTTCTCCAGGGCAACGTT : 1600
clone10 : GTGGTCATGGGACACATATATGAGCTTTGCAACACTCACAGCACTCGGTGCACAATGGTCTTTTCTCCAGGGCAACGTT : 1600
clone8 : GTGGTCATGGGACACATATATGAGCTTTGCAACACTCACAGCACTCGGTGCACAATGGTCTTTTCTCCAGGGCAACGTT : 1600
AF311900.3 : GTGGTCATGGGACACATATATGAGCTTTGCAACACTCACAGCACTCGGTGCACAATGGTCTTTTCTCCAGGGCAACGTT : 1510
GTGGTCATGGGACACATATATGAGCTTTGCAACACTCACAGCACTCGGTGCACAATGGTCTTTTCTCCAGGGCAACGTT

clone9 : CTTTCTAGACGGTCTTCAACCACCAAGGCGAGGGAGCGGGGACCCCAAAGGCCAGAGATGGCACACGCTGGTG : 1680
clone10 : CTTTCTAGACGGTCTTCAACCACCAAGGCGAGGGAGCGGGGACCCCAAAGGCCAGAGATGGCACACGCTGGTG : 1680
clone8 : CTTTCTAGACGGTCTTCAACCACCAAGGCGAGGGAGCGGGGACCCCAAAGGCCAGAGATGGCACACGCTGGTG : 1680
AF311900.3 : CTTTCTAGACGGTCTTCAACCACCAAGGCGAGGGAGCGGGGACCCCAAAGGCCAGAGATGGCACACGCTGGTG : 1590
CTTTCTAGACGGTCTTCAACCACCAAGGCGAGGGAGCGGGGACCCCAAAGGCCAGAGATGGCACACGCTGGTG

clone9 : CCGCTGGGCACGGAGACCATCACCGACAGCTACATGAGTGCACCGGCTCAGACTGGACACTAATTTCTTACGCTTTA : 1760
clone10 : CCGCTGGGCACGGAGACCATCACCGACAGCTACATGAGTGCACCGGCTCAGACTGGACACTAATTTCTTACGCTTTA : 1760
clone8 : CCGCTGGGCACGGAGACCATCACCGACAGCTACATGAGTGCACCGGCTCAGACTGGACACTAATTTCTTACGCTTTA : 1760
AF311900.3 : CCGCTGGGCACGGAGACCATCACCGACAGCTACATGAGTGCACCGGCTCAGACTGGACACTAATTTCTTACGCTTTA : 1670
CCGCTGGGCACGGAGACCATCACCGACAGCTACATGAGTGCACCGGCTCAGACTGGACACTAATTTCTTACGCTTTA

clone9 : CGTAGCGCAAGGCACAAATAAGTCGCAGCAGTACAAGTTCGGCACAGCTACATACCGCTAAAGGAGCCGTAATGAAGA : 1840
clone10 : CGTAGCGCAAGGCACAAATAAGTCGCAGCAGTACAAGTTCGGCACAGCTACATACCGCTAAAGGAGCCGTAATGAAGA : 1840
clone8 : CGTAGCGCAAGGCACAAATAAGTCGCAGCAGTACAAGTTCGGCACAGCTACATACCGCTAAAGGAGCCGTAATGAAGA : 1840
AF311900.3 : CGTAGCGCAAGGCACAAATAAGTCGCAGCAGTACAAGTTCGGCACAGCTACATACCGCTAAAGGAGCCGTAATGAAGA : 1750
CGTAGCGCAAGGCACAAATAAGTCGCAGCAGTACAAGTTCGGCACAGCTACATACCGCTAAAGGAGCCGTAATGAAGA

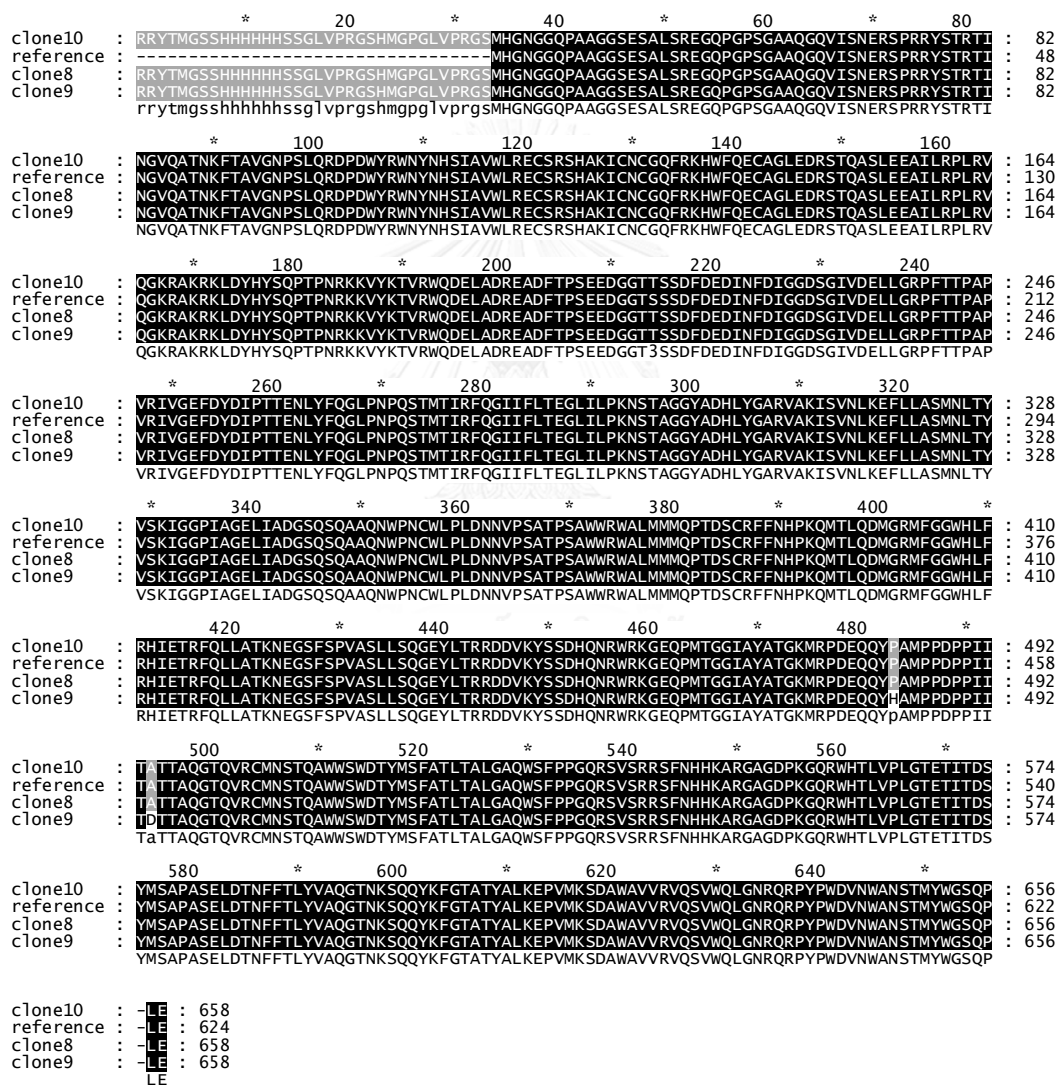
clone9 : GCGATGCATGGGCAGTGGTACCGCTCCAGTCGGTCTGGCAACTGGTAAACAGGCAGAGGCCATACCCATGGGACGTCAAC : 1920
clone10 : GCGATGCATGGGCAGTGGTACCGCTCCAGTCGGTCTGGCAACTGGTAAACAGGCAGAGGCCATACCCATGGGACGTCAAC : 1920
clone8 : GCGATGCATGGGCAGTGGTACCGCTCCAGTCGGTCTGGCAACTGGTAAACAGGCAGAGGCCATACCCATGGGACGTCAAC : 1920
AF311900.3 : GCGATGCATGGGCAGTGGTACCGCTCCAGTCGGTCTGGCAACTGGTAAACAGGCAGAGGCCATACCCATGGGACGTCAAC : 1830
GCGATGCATGGGCAGTGGTACCGCTCCAGTCGGTCTGGCAACTGGTAAACAGGCAGAGGCCATACCCATGGGACGTCAAC

clone9 : TGGGCCAACAGCACCATGTACTGGGGTCCGACCCCTGACTCGAG : 1965
clone10 : TGGGCCAACAGCACCATGTACTGGGGTCCGACCCCTGACTCGAG : 1965
clone8 : TGGGCCAACAGCACCATGTACTGGGGTCCGACCCCTGACTCGAG : 1965
AF311900.3 : TGGGCCAACAGCACCATGTACTGGGGTCCGACCCCTGACTCGAG : 1875
TGGGCCAACAGCACCATGTACTGGGGTCCGACCCCTGACTCGAG

```

รูปที่ 5.9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP2/Δ60N_VP1 ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pET28a (ต่อเนื่อง)

อย่างไรก็ตามเมื่อทำการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลน ทั้ง 3 โคลน เป็นกรดอะมิโนและเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน VP1 และ VP2 ของเชื้อไวรัส Chicken anemia virus ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank (Accession No.AAK70847.2 (VP1) และ AAK70848.2 (VP2)) ดังแสดงในรูปที่ 5.9 พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 8 และ 10 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของไวรัสทุกตำแหน่ง ในขณะที่ลำดับกรดอะมิโนของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 9 มีลำดับกรดอะมิโนที่ต่างกับลำดับกรดอะมิโนของไวรัส จำนวน 2 ตำแหน่ง คือ P479H และ A490D



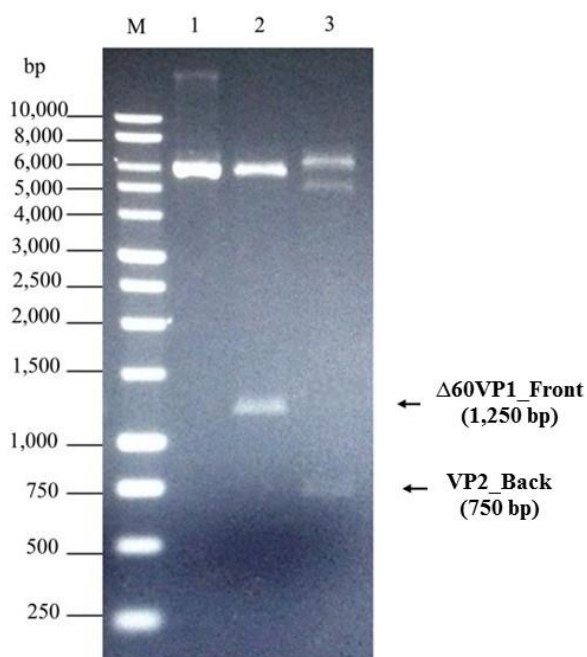
รูปที่ 5.10 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP2/ Δ 60N_VP1 ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pET28a

จากผลการทดลองนี้ จึงสรุปว่า รีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 8 และ 10 ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน VP1 และ VP2 ของไวรัสในทุกตำแหน่งเหมาะสมในการเลือกนำไปใช้ในการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 ในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 8 ด้วยวิธีการเลือกแบบสุ่มสำหรับนำไปใช้ในการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในขั้นต่อไป

5.1.4 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดรูปแบบที่ 4 : pET28- Δ 60N_VP1/VP2

จากการนำชิ้นยีน Δ 60N_VP1_Front และชิ้นยีน VP2_Back ไปโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pGEM[®] - T Easy vector แล้วนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นยีน Δ 60N_VP1_Front และชิ้นยีน VP2_Back ที่ได้วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นจึงทำการเลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนถูกต้องไปเพิ่มจำนวนในแบคทีเรียและทำการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังกล่าว จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นยีน VP2_Back (pGEM T-VP2_Back) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Xho* I แล้วโคลนชิ้นยีน VP2_Back เข้าสู่เวกเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออกของโปรตีน pET28a จากนั้นจึงนำรีคอมบิแนนท์โคลนมาสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและตรวจสอบชิ้นยีน VP2_Back เบื้องต้นด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Xho* I แล้วจึงนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นยีน VP2_Back (pET28 -VP2_Back) ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นทำการเลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ถูกต้องไปเพิ่มจำนวนในแบคทีเรียและทำการสกัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดดังกล่าว ในขณะเดียวกันได้นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นยีน Δ 60N_VP1_Front (pGEM T- Δ 60N_VP1_Front) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Eco* RI แล้วจึงทำการเชื่อมต่อชิ้นยีน Δ 60N_VP1_Front เข้ากับชิ้นดีเอ็นเอเวกเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออกของโปรตีน pET28 -VP2_Back ที่ได้ข้างต้น ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Eco* RI เช่นเดียวกัน จากนั้นจึงคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดซึ่งมีชิ้นยีน Δ 60N_VP1_Front เชื่อมต่อกับชิ้นยีน VP2_Back (pET28- Δ 60N_VP1/VP2) มาสกัดพลาสมิดและตรวจสอบว่ามีชิ้นยีน Δ 60N_VP1/VP2 เบื้องต้นด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสมด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

จากการทดลองพบว่า รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28a- Δ 60N_VP1/VP2 มีขนาดประมาณ 7,300 คู่เบส (รูปที่ 5.10, เลน 1) และภายหลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Eco* RI พบชิ้นดีเอ็นเอของยีน Δ 60N_VP1_Front มีขนาดประมาณ 1,250 คู่เบส ถูกแยกออกจากดีเอ็นเอเวกเตอร์ซึ่งมีขนาดประมาณ 6,050 คู่เบส (รูปที่ 5.10, เลน 2) ในขณะที่เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Xho* I พบชิ้นดีเอ็นเอของยีน VP2_Back มีขนาดประมาณ 750 คู่เบส ถูกแยกออกจากดีเอ็นเอเวกเตอร์ซึ่งมีขนาดประมาณ 6,500 คู่เบส (รูปที่ 5.10, เลน 3)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5.11 ผลของการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28- Δ 60N_VP1/VP2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างๆ

เลน M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Ladder (Promega, USA)

เลน 1 pET28- Δ 60N_VP1/VP2 ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะใดๆ

เลน 2 pET28- Δ 60N_VP1/VP2 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Eco* RI

เลน 3 pET28- Δ 60N_VP1/VP2 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI และ *Xho* I

จากการนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังแสดงในรูปที่ 5.11 พบว่า เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 36 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP1 และ VP2 ของเชื้อไวรัส Chicken anemia virus ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank (Accession No.AF311900.3) พบว่ามีความต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันทั้งสองโคลน จำนวนทั้งสิ้น 56 ตำแหน่ง

```

clone_36 : ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTCCGCGCGGCAGCCATATGGGCCCGGGCTGGTTCC : 80
AF311900.3 : -----ATGGGCCCGGGCTGGTTCC : 20
          *      20      *      40      *      60      *      80
clone_36 : GCGTGGCTCTCTGCCGAACCCCAATCTACTATGACTATCGCTTCCAAGGAAATATTTTCTACGGAAGGACTCATT : 160
AF311900.3 : GCGTGGCTCTCTGCCGAACCCCAATCTACTATGACTATCGCTTCCAAGGAAATATTTTCTACGGAAGGACTCATT : 100
          *      100     *      120     *      140     *      160
clone_36 : TGCCATAAAACAGCAGCAGCGGGGGCTATGCAGACCACGTGACGGGGCAGAGTCGCAAGATCTCGTGAACCTGAAA : 240
AF311900.3 : TGCCATAAAACAGCAGCAGCGGGGGCTATGCAGACCACGTGACGGGGCAGAGTCGCAAGATCTCGTGAACCTGAAA : 180
          *      180     *      200     *      220     *      240
clone_36 : GAGTTCCTCTAGCGTCAATGAACCTGACATACGTGAGCAAAATGGAGGCCCATCGCCGGTGAGTTGATTGGGGACGG : 320
AF311900.3 : GAGTTCCTCTAGCGTCAATGAACCTGACATACGTGAGCAAAATGGAGGCCCATCGCCGGTGAGTTGATTGGGGACGG : 260
          *      260     *      280     *      300     *      320
clone_36 : GTCTCAATCAAGCCGCGCAGAAATGGCCTAATTGCTGGCTGCCGCTAGATAAATACGTCGCCCTCCGCACACCATCGG : 400
AF311900.3 : GTCTCAATCAAGCCGCGCAGAAATGGCCTAATTGCTGGCTGCCGCTAGATAAATACGTCGCCCTCCGCACACCATCGG : 340
          *      340     *      360     *      380     *      400
clone_36 : CATGGTGGAGATGGGCTTAATGATGATGCAGCCACGGACTCTTGCCGGTTCTTTAATCACCCCTAAACAGATGACCCCTG : 480
AF311900.3 : CATGGTGGAGATGGGCTTAATGATGATGCAGCCACGGACTCTTGCCGGTTCTTTAATCACCCCTAAACAGATGACCCCTG : 420
          *      420     *      440     *      460     *      480
clone_36 : CAAGACATGGGTCCATGTTTGGGGCTGGCACCTGTTCCGACACATTGAAACCCGCTTTCAGCTCCTTGGCCACTAAGAA : 560
AF311900.3 : CAAGACATGGGTCCATGTTTGGGGCTGGCACCTGTTCCGACACATTGAAACCCGCTTTCAGCTCCTTGGCCACTAAGAA : 500
          *      500     *      520     *      540     *      560
clone_36 : TGAGGGATCCTTCAGCCCCGTGGCGAGTCTTCTCTCCAGGGAGAGTACCTCACGCGTCGGGACGATGTAAAGTACAGCA : 640
AF311900.3 : TGAGGGATCCTTCAGCCCCGTGGCGAGTCTTCTCTCCAGGGAGAGTACCTCACGCGTCGGGACGATGTAAAGTACAGCA : 580
          *      580     *      600     *      620     *      640
clone_36 : GCGATCACCAGAACCAGTGGCGAAAAGGCGAACACCGATGACGGGGGTATTGCTTATGCGACGGGAAAATGAGACCC : 720
AF311900.3 : GCGATCACCAGAACCAGTGGCGAAAAGGCGAACACCGATGACGGGGGTATTGCTTATGCGACGGGAAAATGAGACCC : 660
          *      660     *      680     *      700     *      720
clone_36 : GACGAGCAACAGTACCCTGCTATGCCCCGACCCCCATATCACCGCTACACAGCGCAAGGACGCAAGTCCGCTG : 800
AF311900.3 : GACGAGCAACAGTACCCTGCTATGCCCCGACCCCCGATATCACCGCTACACAGCGCAAGGACGCAAGTCCGCTG : 740
          *      740     *      760     *      780     *      800
clone_36 : CATGAAAGCAGCAAGCTTGGTGGCTGTTGGACACATATATGAGCTTTGCAACACTCACAGCGCTCGGTGCACAATGGT : 880
AF311900.3 : CATGAAAGCAGCAAGCTTGGTGGCTGTTGGACACATATATGAGCTTTGCAACACTCACAGCGCTCGGTGCACAATGGT : 820
          *      820     *      840     *      860     *      880
clone_36 : CTTTTCCTCCAGGGCAACGTTCTGTTTCTAGACGTTCTCAACCACCAAAAGCAGAGGGGCGCCGGGACCCCAAAGG : 960
AF311900.3 : CTTTTCCTCCAGGGCAACGTTCTGTTTCTAGACGTTCTCAACCACCAAAAGCAGAGGGGCGCCGGGACCCCAAAGG : 900
          *      900     *      920     *      940     *      960
clone_36 : CAGAGATGGCACACGCTGTTCCGCTGGCACAGACCATCACGACAGCTACATGAGCGCCGCTCAGAGCTGGA : 1040
AF311900.3 : CAGAGATGGCACACGCTGTTCCGCTGGCACAGACCATCACGACAGCTACATGAGCGCCGCTCAGAGCTGGA : 980
          *      980     *      1000    *      1020    *      1040

```

รูปที่ 5.12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pET28a

```

clone_36 : CACAAATTTCTTTACGCTTTACGTAGCGCAAGGCACAAATAAATCGCAGCAGTACAAGTTCCGGCACAGCTACATACCGG : 1120
AF311900.3 : CACAAATTTCTTTACGCTTTACGTAGCGCAAGGCACAAATAAATCGCAGCAGTACAAGTTCCGGCACAGCTACATACCGG : 1060
          CACTAATTTCTTTACGCTTTACGTAGCGCAAGGCACAAATAAAGTCGCAGCAGTACAAGTTCCGGCACAGCTACATACCGG

clone_36 : TAAAGGAGCCGTGAATGAAGAGCGATGCATGGGGCTGTGTACGGCTCCAGTCGGTCTGGCAACTGGGTAACAGGCAAGG : 1200
AF311900.3 : TAAAGGAGCCGTGAATGAAGAGCGATGCATGGGGCTGTGTACGGCTCCAGTCGGTCTGGCAACTGGGTAACAGGCAAGG : 1140
          TAAAGGAGCCAGTAATGAAGAGCGATGCATGGGGCAAGTCGCAGCAGTACAAGTTCCGGCACAGCTACATACCGG

clone_36 : CCATACCCATGGGACGTCAACTGGGCCAACAGCACCATGACTGGGGTGCAGCCCGGTGAATTCGATATGATATCCC : 1280
AF311900.3 : CCATACCCATGGGACGTCAACTGGGCCAACAGCACCATGACTGGGGTGCAGCCCGGTGAATTCGATATGATATCCC : 1220
          CCATACCCATGGGACGTCAACTGGGCCAACAGCACCATGACTGGGGTGCAGCCCGGTGAATTCGATATGATATCCC

clone_36 : GACCACGGAGAACCTGTACTTCCAAGGCATGCACGGGAACGGCGGACAACCGGCCGCTGGGGCAGTGAATCGGGCTTA : 1360
AF311900.3 : GACCACGGAGAACCTGTACTTCCAAGGCATGCACGGGAACGGCGGACAACCGGCCGCTGGGGCAGTGAATCGGGCTTA : 1300
          GACCACGGAGAACCTGTACTTCCAAGGCATGCACGGGAACGGCGGACAACCGGCCGCTGGGGCAGTGAATCGGGCTTA

clone_36 : GCCGAGAGGGGCAACCTGGGCCAGCGGAGCCCGCAGGGGCAAGTAATTTCAAATGAACGCTCTCCAAGAGATACTCC : 1440
AF311900.3 : GCCGAGAGGGGCAACCTGGGCCAGCGGAGCCCGCAGGGGCAAGTAATTTCAAATGAACGCTCTCCAAGAGATACTCC : 1380
          GCCGAGAGGGGCAACCTGGGCCAGCGGAGCCCGCAGGGGCAAGTAATTTCAAATGAACGCTCTCCAAGAGATACTCC

clone_36 : ACCCGGACCATCAACGGTGTTCAGGCCACCAACAAGTTACGGCCGTTGGAAACCCCTCACTGCAGAGAGATCCGGATTG : 1520
AF311900.3 : ACCCGGACCATCAACGGTGTTCAGGCCACCAACAAGTTACGGCCGTTGGAAACCCCTCACTGCAGAGAGATCCGGATTG : 1460
          ACCCGGACCATCAACGGTGTTCAGGCCACCAACAAGTTACGGCCGTTGGAAACCCCTCACTGCAGAGAGATCCGGATTG

clone_36 : GTATCGTGGAAATACAATCACTCTATCGCTGTGTGGCTGGCGAATGCTCGCGTCCCAAGCTAAGATCTGCAACTGCC : 1600
AF311900.3 : GTATCGTGGAAATACAATCACTCTATCGCTGTGTGGCTGGCGAATGCTCGCGTCCCAAGCTAAGATCTGCAACTGCC : 1540
          GTATCGTGGAAATACAATCACTCTATCGCTGTGTGGCTGGCGAATGCTCGCGTCCCAAGCTAAGATCTGCAACTGCC

clone_36 : GACAAATTCAGAAAGCACTGGTTTCAAGAATGTGCCGGACTTGAGGACCGATCAACCCAAGCCTCCCTCGAAGAAGCGATC : 1680
AF311900.3 : GACAAATTCAGAAAGCACTGGTTTCAAGAATGTGCCGGACTTGAGGACCGATCAACCCAAGCCTCCCTCGAAGAAGCGATC : 1620
          GACAAATTCAGAAAGCACTGGTTTCAAGAATGTGCCGGACTTGAGGACCGATCAACCCAAGCCTCCCTCGAAGAAGCGATC

clone_36 : CTGGACCCCTCCGAGTACAGGGTAAGCGAGCTAAAAGAAAGCTTGATTACCACTACTCCAGCCGACCCGAACCGCAA : 1760
AF311900.3 : CTGGACCCCTCCGAGTACAGGGTAAGCGAGCTAAAAGAAAGCTTGATTACCACTACTCCAGCCGACCCGAACCGCAA : 1700
          CTGGACCCCTCCGAGTACAGGGTAAGCGAGCTAAAAGAAAGCTTGATTACCACTACTCCAGCCGACCCGAACCGCAA

clone_36 : GAAGGTGTATAAGACTGTAAGATGGCAAGACGAGCTCGCAGACCGAGAGGCGGATTTACGCCTTCAGAAGAGGACGGTG : 1840
AF311900.3 : GAAGGTGTATAAGACTGTAAGATGGCAAGACGAGCTCGCAGACCGAGAGGCGGATTTACGCCTTCAGAAGAGGACGGTG : 1780
          GAAGGTGTATAAGACTGTAAGATGGCAAGACGAGCTCGCAGACCGAGAGGCGGATTTACGCCTTCAGAAGAGGACGGTG

clone_36 : GCACCACTCAAGCGACTTCGACGAAGATATAAATTCGACATCGGAGGAGACAGCGGTATCGTAGACGAGCTTTTAGGA : 1920
AF311900.3 : GCACCACTCAAGCGACTTCGACGAAGATATAAATTCGACATCGGAGGAGACAGCGGTATCGTAGACGAGCTTTTAGGA : 1860
          GCACCACTCAAGCGACTTCGACGAAGATATAAATTCGACATCGGAGGAGACAGCGGTATCGTAGACGAGCTTTTAGGA

clone_36 : AGGCCTTTTCAACCCCGCCCGGTACGTATAGTGTGACTCGAG : 1965
AF311900.3 : AGGCCTTTTCAACCCCGCCCGGTACGTATAGTGTGACTCGAG----- : 1899
          AGGCCTTTTCAACCCCGCCCGGTACGTATAGTGTGACTcgag

```

รูปที่ 5.13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pET28a (ต่อเนื่อง)

อย่างไรก็ตามเมื่อทำการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลน 36 เป็นกรดอะมิโนและเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน VP1 และ VP2 ของเชื้อไวรัส Chicken anemia virus ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank (Accession No. AAK70847.2 (VP1) และ AAK70848.2 (VP2)) ดังแสดงในรูปที่ 5.12 พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลน ทั้งสองเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของไวรัสทุกตำแหน่ง

จากผลการทดลองนี้ จึงสรุปว่า รีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 36 ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน VP1 และ VP2 ของไวรัสในทุกตำแหน่ง จึงเหมาะสมในการเลือกนำไปใช้ในการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ ในขั้นต่อไป

```

clone_36 : ---MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMGPGLVPRGSLPNPQSTMTIRFQGIIFLTEGLILPKNSTAGGYADHLYGARVAKISVN : 82
Reference : -----MGPGLVPRGSLPNPQSTMTIRFQGIIFLTEGLILPKNSTAGGYADHLYGARVAKISVN : 58
          *          20          *          40          *          60          *          80
clone_36 : LKEFLLASMNLTYYVKIGGPIAGELIADGSQSQAQNWPNCWLPDNNVPSATPSAWWRWALMMMQPTDSCRFFNHPKQMTL : 164
Reference : LKEFLLASMNLTYYVKIGGPIAGELIADGSQSQAQNWPNCWLPDNNVPSATPSAWWRWALMMMQPTDSCRFFNHPKQMTL : 140
          *          100         *          120         *          140         *          160
clone_36 : QDMGRMFGGWHLFRHIETRFQLLATKNEGSFSPVALLSQGEYLTRRDDVKYSSDHQNRWRKGEQPMTGGIAYATGKMRPDE : 246
Reference : QDMGRMFGGWHLFRHIETRFQLLATKNEGSFSPVALLSQGEYLTRRDDVKYSSDHQNRWRKGEQPMTGGIAYATGKMRPDE : 222
          *          180         *          200         *          220         *          240
clone_36 : QQYPAMPDPPIITATTAQGTQVRCMNSTQAWWSWDTYMSFATLTALGAQWSFPPGQRSVSRRSFNHHKARGAGDPKQQRWH : 328
Reference : QQYPAMPDPPIITATTAQGTQVRCMNSTQAWWSWDTYMSFATLTALGAQWSFPPGQRSVSRRSFNHHKARGAGDPKQQRWH : 304
          *          260         *          280         *          300         *          320
clone_36 : TLVPLGTETITDSYMSAPASELDTNFFFLYVAQGTNKSQYKFGTATYALKEPVMKSDAWAVVRVQSVWQLGNRQRPYPWDV : 410
Reference : TLVPLGTETITDSYMSAPASELDTNFFFLYVAQGTNKSQYKFGTATYALKEPVMKSDAWAVVRVQSVWQLGNRQRPYPWDV : 386
          *          340         *          360         *          380         *          400
clone_36 : NWANSTMWGSQPGDFDYDIPITTENLYFQGMHNGGQPAAGGSESALSREGQPGPSGAAQGVISNERSPRRYSTRTINGVQ : 492
Reference : NWANSTMWGSQPGDFDYDIPITTENLYFQGMHNGGQPAAGGSESALSREGQPGPSGAAQGVISNERSPRRYSTRTINGVQ : 468
          *          420         *          440         *          460         *          480
clone_36 : ATNKFTAVGNPSLQRDPDWRWYNHNSIAVWLRCSRSHAKICNCGQFRKHWFFQECAGLEDRSTQASLEEAILRPLRVQGKR : 574
Reference : ATNKFTAVGNPSLQRDPDWRWYNHNSIAVWLRCSRSHAKICNCGQFRKHWFFQECAGLEDRSTQASLEEAILRPLRVQGKR : 550
          *          500         *          520         *          540         *          560
clone_36 : AKRRLDYHYSQPTPNRKKVYKTVRWQDELADREADFTPSEEDGGT3SSDFDEDINFDIGGDSGIVDELLGRPFTTPAPVRIV : 656
Reference : AKRRLDYHYSQPTPNRKKVYKTVRWQDELADREADFTPSEEDGGT3SSDFDEDINFDIGGDSGIVDELLGRPFTTPAPVRIV : 632
          *          580         *          600         *          620         *          640
clone_36 : --- : 658
Reference : --- : -
          1e

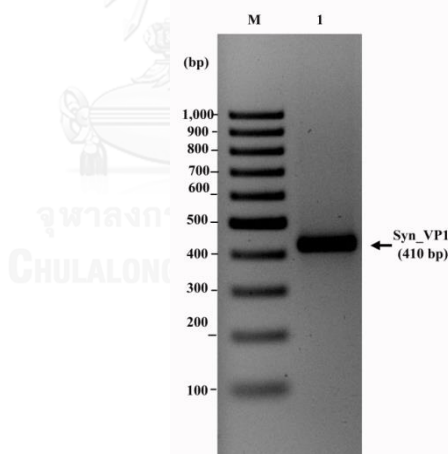
```

รูปที่ 5.14 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pET28a

5.1.5 การสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดรูปแบบที่ 5 : pET28-VP2/Full length VP1

สำหรับการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดรูปแบบที่ 5 นี้ พบปัญหาว่าชิ้นส่วนของยีน VP1 ที่มีขนาดเต็ม (Full length VP1) ไม่สามารถเพิ่มจำนวน ด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส์โดยใช้ ดีเอ็นเอซึ่งสกัดจากอวัยวะม้ามของไก่ติดเชื้อไวรัส CAV เป็นดีเอ็นเอต้นแบบได้ แม้ได้พยายามปรับเปลี่ยนและหาสภาวะที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส์แล้วแต่ไม่ประสบผลสำเร็จ อย่างไรก็ตามจึงได้หาวิธีอื่นที่เหมาะสมโดยการสังเคราะห์ยีน VP1 บางส่วน (Syn_VP1) จำนวน 410 คู่เบส ตั้งแต่ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1 ถึง 356 ของยีน VP1 ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนในส่วนด้านปลาย N – terminal ของโปรตีน VP1 ซึ่งมีกรดอะมิโนอาร์จินีนเป็นจำนวนมากมีความยาวประมาณ 60 กรดอะมิโน ($\Delta 60N$) นอกจากนี้ยังครอบคลุมถึงตำแหน่งตัดจำเพาะ *Nhe* I สำหรับตัดต่อชิ้นยีนดังกล่าวเพื่อเชื่อมเข้ากับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด VP2/ $\Delta 60N$ _VP1

จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน Syn_VP1 โดยอาศัยไพรเมอร์ จำนวน 10 เส้น ดังแสดงในตารางที่ 3.5 ด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส์แบบซ้อนทับ (overlapping PCR) ตามวิธีการที่ 4.2.2.4 นำชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Syn_VP1 ที่เกิดจากไพรเมอร์แต่ละคู่ ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสพบขนาดของชิ้นยีน Syn_VP1 ประมาณ 410 คู่เบส (รูปที่ 5.13, เลน 1)



รูปที่ 5.15 ผลของการรันอะกาโรสเจล 1% ของผลิตภัณฑ์ PCR ของชิ้นส่วนยีน Syn_VP1 ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส์แบบซ้อนทับ (overlapping PCR)

เลน M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder (Promega, USA)

เลน 1 ชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน Syn_VP1

และเมื่อทำการโคลนชิ้นยีนที่มีขนาด 410 คู่เบสเข้าสู่เวกเตอร์ pGEM[®] - T Easy vector แล้วนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีชิ้นยีน Syn_VP1 ที่ได้วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์และตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน พบว่า เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 29 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VP1 ของเชื้อไวรัส Chicken anemia virus ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank (Accession No.AF311900.3) (รูปที่ 5.14) พบว่าไม่มี ความต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์

```

SynVP1_29 :      *      20      *      40      *      60      *      80
AM407859.1 : -----ATGGGGGAATTCGATTATGATATCCCGACCACGGAGAACCTGTACTTCCAAGGCATGGCA : 83
                                         ATGGCA : 6
                                         ATGGCA

SynVP1_29 :      *      100     *      120     *      140     *      160
AM407859.1 : AGACGAGCTCGCAGACCCGAGAGGCCGATTTACGCCTTCAGAAGAGGACGGTGGCACAACCTCAAGCGACTTCGACGAAGATA : 166
AGACGAGCTCGCAGACCCGAGAGGCCGATTTACGCCTTCAGAAGAGGACGGTGGCACAACCTCAAGCGACTTCGACGAAGATA : 89
AGACGAGCTCGCAGACCCGAGAGGCCGATTTACGCCTTCAGAAGAGGACGGTGGCACAACCTCAAGCGACTTCGACGAAGATA

SynVP1_29 :      *      180     *      200     *      220     *      240
AM407859.1 : TAAACTTCGACATCGGAGGAGACAGCGGTATCGTAGACGAGCTTTAGGAAGGCCTTTCAACACCCCGCCCGGTACGTATA : 249
TAAACTTCGACATCGGAGGAGACAGCGGTATCGTAGACGAGCTTTAGGAAGGCCTTTCAACACCCCGCCCGGTACGTATA : 172
TAAACTTCGACATCGGAGGAGACAGCGGTATCGTAGACGAGCTTTAGGAAGGCCTTTCAACACCCCGCCCGGTACGTATA

SynVP1_29 :      *      260     *      280     *      300     *      320     *
AM407859.1 : GTGTGAGGCTGCCGAACCCCAATCTACTATGACTATCCGCTTCCAAGGAATCATCTTTCTCACGGAAGGACTCATTCTGCCT : 332
GTGTGAGGCTGCCGAACCCCAATCTACTATGACTATCCGCTTCCAAGGAATCATCTTTCTCACGGAAGGACTCATTCTGCCT : 255
GTGTGAGGCTGCCGAACCCCAATCTACTATGACTATCCGCTTCCAAGGAATCATCTTTCTCACGGAAGGACTCATTCTGCCT

SynVP1_29 :      340      *      360      *      380      *      400      *
AM407859.1 : AAAAAACAGCACAGCGGGGGGCTATGCAGACCCTTGTACGGGGCGAGAGTCGCCAAGATCTCCGTGAACCTGAAAGAGTTTCCT : 415
AAAAACAGCACAGCGGGGGGCTATGCAGACCCTTGTACGGGGCGAGAGTCGCCAAGATCTCCGTGAACCTGAAAGAGTTTCCT : 338
AAAAACAGCACAGCGGGGGGCTATGCAGACCCTTGTACGGGGCGAGAGTCGCCAAGATCTCCGTGAACCTGAAAGAGTTTCCT

SynVP1_29 :      *
AM407859.1 : GCTAGCGTCAATGAACCT : 433
GCTAGCGTCAATGAACCT : 356
GCTAGCGTCAATGAACCT

```

รูปที่ 5.16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Syn_VP1 ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pGEM[®]-T easy vector

และเมื่อแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนดังกล่าวเป็นกรดอะมิโนและเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน VP1 ของเชื้อไวรัส Chicken anemia virus ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank (Accession No. AAK70847.2) (รูปที่ 5.15) พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของไวรัสทุกตำแหน่ง

```

Syn_VP1-29 :      *      20      *      40      *      60      *      80
CAL59492.1 : MGEFDYDIPTTENLYFQGMARRARRPRGRFYAFRRGRWHNLKRLRRRYKLRHRRRQYRRRAFRKAFHNPRPGTYSVRLPNPQ : 83
-----MARRARRPRGRFYAFRRGRWHNLKRLRRRYKLRHRRRQYRRRAFRKAFHNPRPGTYSVRLPNPQ : 65
MARRARRPRGRFYAFRRGRWHNLKRLRRRYKLRHRRRQYRRRAFRKAFHNPRPGTYSVRLPNPQ

Syn_VP1-29 :      *      100     *      120     *
CAL59492.1 : STMTIRFQGIIFLTEGLILPKNSTAGGYADHLYGARVAKISVNLKEFLASMNL : 137
STMTIRFQGIIFLTEGLILPKNSTAGGYADHLYGARVAKISVNLKEFLASMNL : 119
STMTIRFQGIIFLTEGLILPKNSTAGGYADHLYGARVAKISVNLKEFLASMNL

```

รูปที่ 5.17 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Syn_VP1 ที่เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pGEM[®]-T easy vector

จากการทดลองนี้จึงได้นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดโคลนที่ 29 มาเพิ่มจำนวนและสกัดพลาสมิด จากนั้นจึงนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEM T - Syn_VP1 โคลนที่ 29 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Nhe* I แล้วเชื่อมชิ้น Syn_VP1 เข้ากับเวกเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออก pET 28-VP2/ Δ 60N_VP1 ซึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และ *Nhe* I เช่นเดียวกัน พบว่า ภายหลังจากเคลื่อนย้ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* สายพันธุ์ DH5 α และทำการบ่มเชื้อตามวิธีการที่ 4.25 พบมีรีคอมบิแนนท์โคลนที่สามารถเจริญได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะกามัยซินเป็นตัวคัดเลือก แต่พบลักษณะโคโลนีที่ผิดปกติอันเนื่องจากแบคทีเรียตาย จึงไม่สามารถทำการทดลองเพื่อคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนต่อไปได้ จากผลการทดลองดังกล่าวจึงไม่สามารถสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดรูปแบบที่ 5 VP2/VP1 ได้

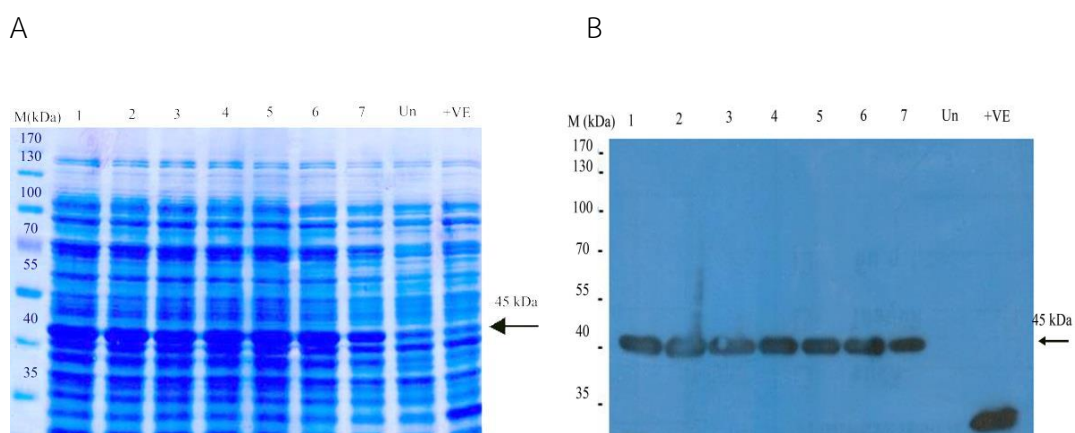


5.2 การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในแบคทีเรีย *E.coli*

เมื่อได้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้ง 4 รูปแบบ ได้แก่ pET28a- Δ 60N_VP1, pET28a-VP2, pET28a-VP2/ Δ 60N_VP1 และ pET28a- Δ 60N_VP1/VP2 ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนถูกต้อง จึงได้นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแต่ละรูปแบบทำการเคลื่อนย้ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* สายพันธุ์ Roseta-gami บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่คัดเลือกด้วยยาปฏิชีวนะ โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 12 – 16 ชั่วโมง แล้วเลือกโคลนีเดี่ยวแบบสุ่ม จำนวน 7 โคลน มาทำการแสดงออกของโปรตีน โดยเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 30° ซ และชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนด้วย isopropyl- β -D-1-thiogalactoside (IPTG) ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากตรวจสอบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วยวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ แล้วจึงคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนที่มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนสูงสุดมา จำนวน 3 โคลน ทำการแสดงออกของโปรตีนอีกครั้งและคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนที่มีการแสดงออกของโปรตีนสูงสุดเพียงโคลนเดียว และนำไปใช้ในการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของโปรตีน โดยเริ่มจากการแปรผันความเข้มข้นของ IPTG ที่ใช้ชักนำให้มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน หลังจากนั้นจึงแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนและทดสอบความสามารถในการละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่แต่ละอุณหภูมิ แล้วจึงแปรผันระยะเวลาที่ใช้ในการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเป็นลำดับสุดท้าย จากการทดลองดังกล่าวได้ผลการศึกษาของแต่ละรีคอมบิแนนท์โปรตีน ดังนี้

5.2.1 ผลการแสดงผลของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$

จากผลการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนที่สามารถสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ พบว่ารีคอมบิแนนท์โคลนที่ถูกคัดเลือกทั้ง 7 โคลน ภายหลังจากชักนำด้วย IPTG แล้วสามารถแสดงออกกรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ได้ทุกโคลน โดยพบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน (kDa) มีปริมาณเพิ่มขึ้น (รูปที่ 5.16A, เลน 1-7) เมื่อเปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28 เปล่า (รูปที่ 5.16A, เลน Un) ซึ่งขนาดที่เพิ่มขึ้นนั้นเป็นขนาดเดียวกับขนาดที่ประมาณการไว้จากลำดับกรดอะมิโน

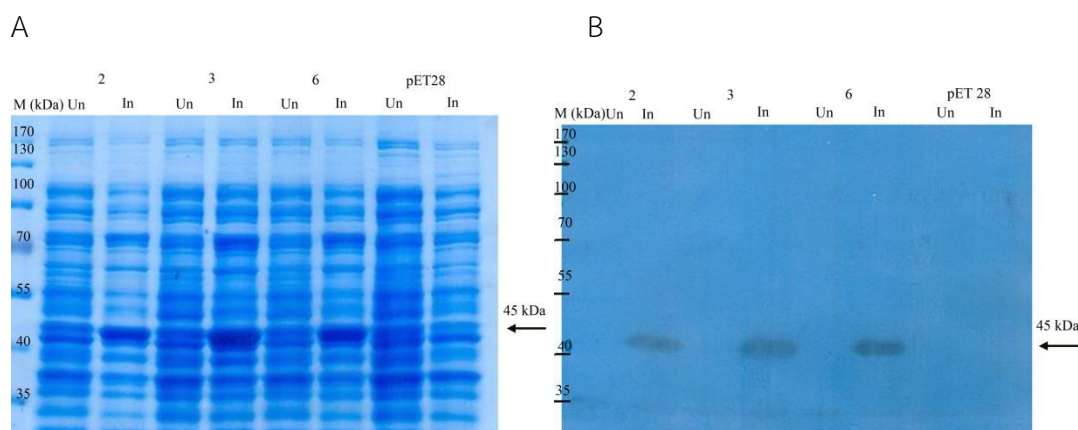


รูปที่ 5.18 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดจากเซลล์ *E. coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 - $\Delta 60N_VP1$ จำนวน 7 โคลนที่ถูกชักนำด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG ที่อุณหภูมิ 30 ° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

- | | |
|-----------|---|
| เลน M | Protein Marker (Fermentas, U.S.A) |
| เลน 1 – 7 | รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 - $\Delta 60N_VP1$ โคลนที่ 1 – 7 ตามลำดับ |
| เลน Un | รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 ที่ไม่มีการชักนำด้วย IPTG |
| เลน +VE | รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -IHNV |

นอกจากนี้ผลจากการตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วยวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ซึ่งมี His₆ Tag และใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิดอื่นที่มี His₆ Tag เช่นเดียวกัน (รูปที่ 5.16B, เลน +VE) เป็นตัวควบคุมบวก พบแถบสัญญาณปรากฏที่ขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน (kDa) ทั้ง 7 เลน (รูปที่ 5.16B, เลน 1-7) จึงยืนยันได้ว่ารีคอมบิแนนท์โคลนทั้ง 7 โคลน สามารถชักนำให้มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตันได้จึงคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนมา จำนวน 3 โคลน ดังนี้คือ 2, 3 และ 6 ไปทำการแสดงออกของโปรตีนโดยใช้

สภาวะการชักนำเช่นเดิม ผลพบว่ารีคอมบิแนนท์โคลนทั้ง 3 โคลน มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน โดยรีคอมบิแนนท์โคลนที่ 3 สามารถแสดงออกรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ได้เหมาะสมที่สุดโดยมีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ มากสุด เมื่อเปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์โคลนที่ 2 และ 6 (รูปที่ 5.17A และ 5.17B) ในการศึกษาจึงได้เลือกรีคอมบิแนนท์โคลนที่ 3 สำหรับนำไปใช้ทดลองในขั้นต่อไป



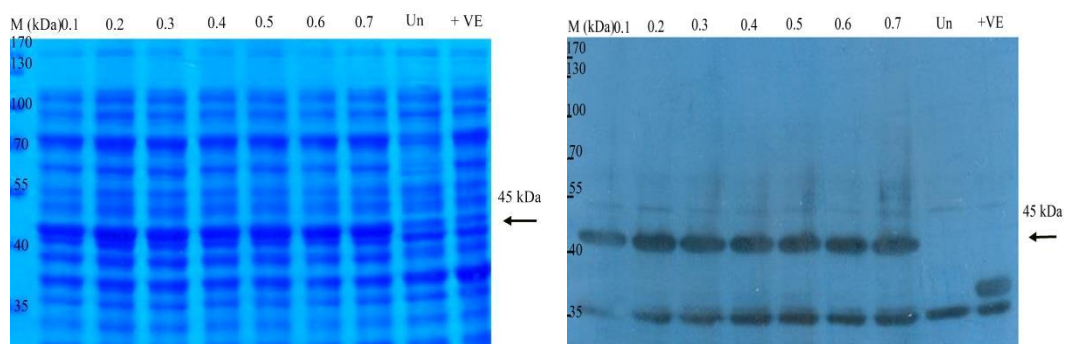
รูปที่ 5.19 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E. coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 - $\Delta 60N_VP1$ จำนวน 3 โคลน ที่ถูกชักนำด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG ที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

- | | |
|------------|--|
| เลน M | Protein Marker (Fermentas, U.S.A) |
| เลน Un | ไม่มีการชักนำด้วย IPTG |
| เลน In | มีการชักนำด้วย IPTG |
| เลน +VE | รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -IHHNV |
| 2, 3 และ 6 | รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 - $\Delta 60N_VP1$ โคลนที่ 2, 3 และ 6 ตามลำดับ |
| pET 28 | รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 |

หลังจากนั้นจึงได้นำรีคอมบิแนนท์โคลนที่ 3 มาศึกษาการแปรผันปริมาณ IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายที่ใช้ชักนำให้มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ตั้งแต่ 0.1 – 0.7 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบกับเมื่อไม่ได้ชักนำด้วย IPTG พบว่าความเข้มข้นของ IPTG สุดท้ายทั้ง 7 ระดับ สามารถชักนำการแสดงออกรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ได้ โดยพบแถบโปรตีนขนาด ประมาณ 45 กิโลดาลตัน (kDa) มีปริมาณเพิ่มขึ้นในทุกเลน (รูปที่ 5.18A, เลน 1-7) เมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อไม่ได้ชักนำด้วย IPTG (รูปที่ 5.18 A, เลน Un) สอดคล้องกับผลของวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ และใช้ รีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิดอื่นที่มี His₆ Tag เช่นเดียวกัน (รูปที่ 5.18A, เลน +VE) เป็นตัวควบคุมบวก พบแถบสัญญาณขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน (kDa) ในทุกเลน (รูปที่ 5.18B, เลน 0.1-0.7) จึงยืนยันได้ว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ พบได้ที่ขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน (kDa) โดยที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของ IPTG 0.2 มิลลิโมลาร์ สามารถชักนำให้รีคอมบิแนนท์โคลนมีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ได้ในระดับที่เหมาะสมที่สุดโดยมีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อใช้ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของ IPTG อื่นๆ อีก 6 ระดับ

A

B



รูปที่ 5.18 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E. coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 - $\Delta 60N_VP1$ โคลนที่ 3 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

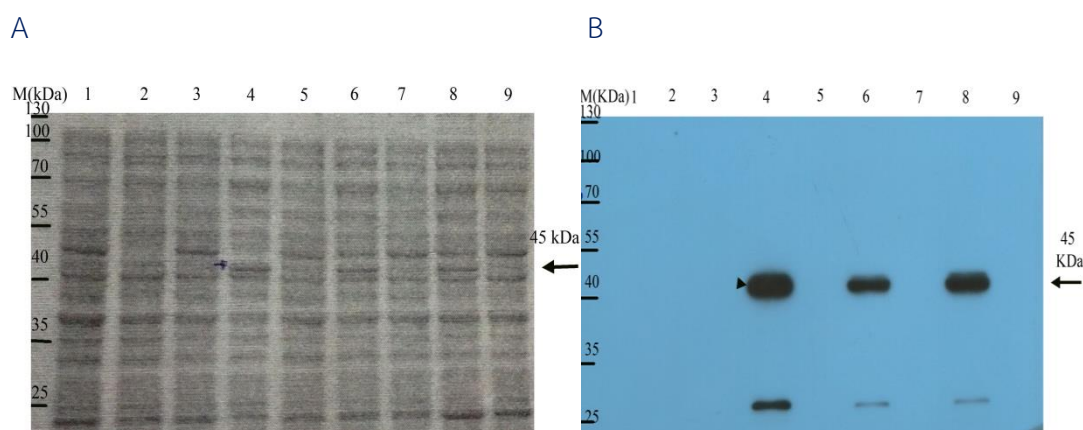
เลน M Protein Marker (Fermentas, U.S.A)

เลน Un ไม่มีการชักนำด้วย IPTG

เลน +VE รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -IHNV ที่มีการชักนำด้วย IPTG

0.1 – 0.7 รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 - $\Delta 60N_VP1$ โคลนที่ 3 ถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 – 0.7 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

ในการทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ จึงได้นำรีคอมบิแนนท์โคลน pET28- $\Delta 60N_VP1$ โคลนที่ 3 มาชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน ด้วยความเข้มข้นสุดท้ายของ IPTG 0.2 มิลลิโมลาร์ โดยใช้อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้คือ 16° ซ, 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ พบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน (kDa) มีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อใช้อุณหภูมิที่ 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ (รูปที่ 5.19A, เลน 2, 4, 6 และ 8) ในขณะที่อุณหภูมิ 16° ซ ไม่พบการเพิ่มขึ้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (รูปที่ 5.19A, เลน 2) เมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อไม่ได้ชักนำด้วย IPTG (รูปที่ 5.19A, เลน 1, 3, 5 และ 7)



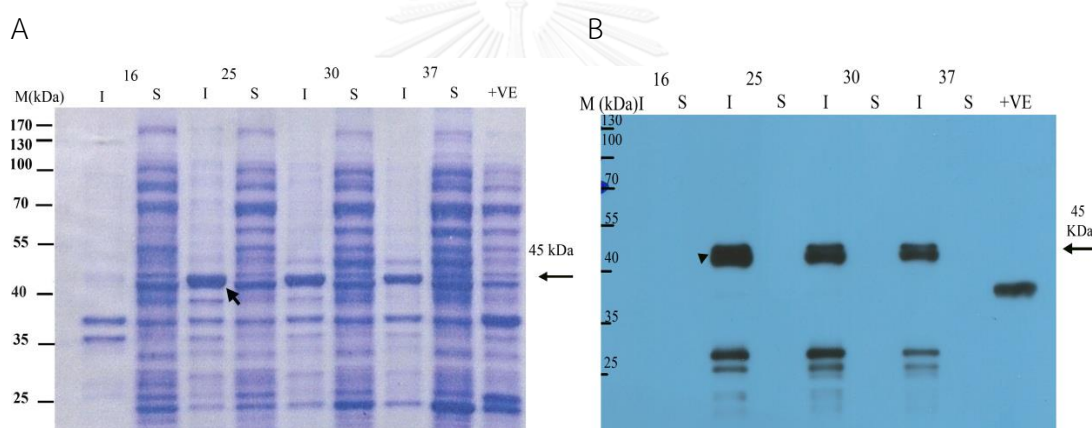
รูปที่ 5.19 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E. coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28- $\Delta 60N_VP1$ โคลนที่ 3 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิต่างๆ

เลน M	Protein Marker (Fermentas, U.S.A)
เลน 1, 3, 5, 7	ไม่มีการชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 16° ซ, 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ ตามลำดับ
เลน 2, 4, 6, 8	มีการชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 16° ซ, 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ ตามลำดับ
เลน 9	รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 ที่มีการชักนำด้วย IPTG

สอดคล้องกับผลของวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ และใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิดอื่นที่มี His₆ Tag เช่นเดียวกัน (รูปที่ 5.19B, เลน +VE) เป็นตัวควบคุมบวก พบแถบสัญญาณขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน (kDa) ที่อุณหภูมิ 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ (รูปที่ 5.19B, เลน 4, 6 และ 8) ในขณะที่อุณหภูมิ 16° ซ ไม่พบแถบสัญญาณที่ขนาดดังกล่าว (รูปที่ 5.19B, เลน 2) จากผลการทดลองแสดงว่าที่อุณหภูมิ 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ เกิดขึ้น และพบการย่อยของโปรตีนบางส่วนโดยสังเกตได้จากแถบสัญญาณที่เกิดขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ เมื่อใช้อุณหภูมิทั้ง 3 อุณหภูมินี้ พบว่า รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ สามารถแสดงออกได้ในระดับที่เหมาะสมที่สุดเมื่อใช้อุณหภูมิ 25° ซ โดยมีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อใช้อุณหภูมิ 30° ซ และ 37° ซ



เมื่อนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ซึ่งแสดงออกที่อุณหภูมิต่างๆทั้ง 4 อุณหภูมิ มาทดสอบคุณสมบัติการละลายของโปรตีนพบแถบรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน (kDa) ที่อุณหภูมิ 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ อยู่ในส่วนที่ไม่ละลาย ในขณะที่อุณหภูมิ 16° ซ ไม่พบแถบรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ที่ขนาดดังกล่าวทั้งในส่วนที่ละลายและไม่ละลาย (รูปที่ 5.20A) สอดคล้องกับผลการทดสอบด้วยวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ และใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิดอื่นที่มี His₆ Tag เช่นเดียวกันเป็นตัวควบคุมบวก พบแถบสัญญาณขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน (kDa) ที่อุณหภูมิ 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ ในส่วนที่ไม่ละลายเช่นเดียวกัน และพบการย่อยของโปรตีนบางส่วนโดยสังเกตได้จากแถบสัญญาณที่เกิดขึ้นทั้งสามอุณหภูมิ (รูปที่ 5.20B) แต่ในส่วนที่ละลายไม่พบแถบสัญญาณใดๆปรากฏ ในขณะที่อุณหภูมิ 16° ซ ซึ่งไม่พบแถบสัญญาณใดๆ ที่ขนาดดังกล่าวเกิดขึ้นในทั้งสองส่วน

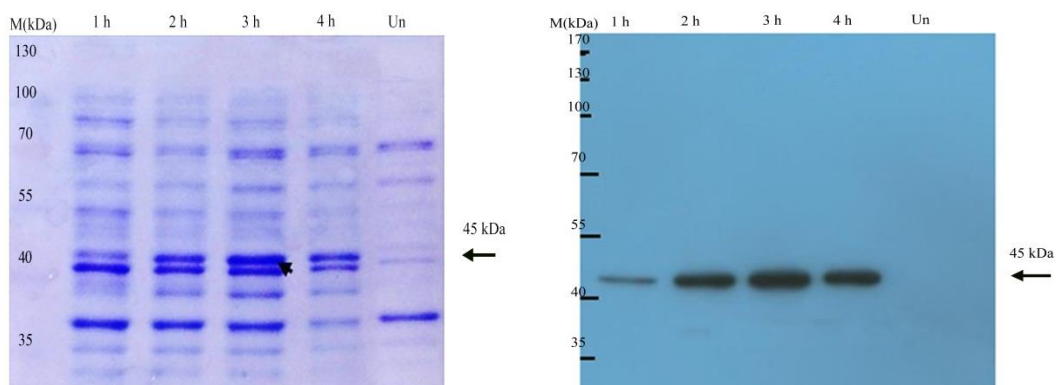


รูปที่ 5.20 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของการทดสอบคุณสมบัติการละลายของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E.coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28- $\Delta 60N_VP1$ โคลนที่ 3 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิต่างๆ

เลน M	Protein Marker (Fermentas, U.S.A)
เลน I	ส่วนที่ไม่ละลาย (Inclusion bodies)
เลน S	ส่วนที่ละลาย (Supernatant)
เลน +VE	รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -IHHNV ที่มีการชักนำด้วย IPTG
16, 25, 30, 37	อุณหภูมิ 16° ซ, 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ ตามลำดับ

จากผลการทดลองนี้จึงทำการเลือกอุณหภูมิ 25° ซ เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ละลาย

ในการทดลองสุดท้ายจึงได้หาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ จึงได้นำรีคอมบิแนนท์โคลน pET28- $\Delta 60N_VP1$ โคลนที่ 3 มาชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน ด้วยความเข้มข้นสุดท้ายของ IPTG 0.2 มิลลิโมลาร์ และใช้อุณหภูมิ 25° ซ โดยใช้เวลาในการชักนำให้มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ต่างๆ ดังนี้คือ 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง พบแถบรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน (kDa) มีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อไม่ได้ชักนำด้วย IPTG (รูปที่ 5.21A, เลน Un) ในทุกเลนทั้ง 4 ชั่วโมง (รูปที่ 5.21A, เลน 1h – 4h) โดยพบรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ มีการแสดงออกสูงสุดเมื่อใช้ระยะเวลาในการชักนำที่ 3 ชั่วโมง



รูปที่ 5.21 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E. coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28- $\Delta 60N_VP1$ โคลนที่ 3 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25° ซ เมื่อใช้ระยะเวลาในการชักนำต่างๆ

เลน M	Protein Marker (Fermentas, U.S.A)
เลน 1 h – 4 h	ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ซึ่งใช้ชักนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน
เลน Un	ไม่มีการชักนำด้วย IPTG

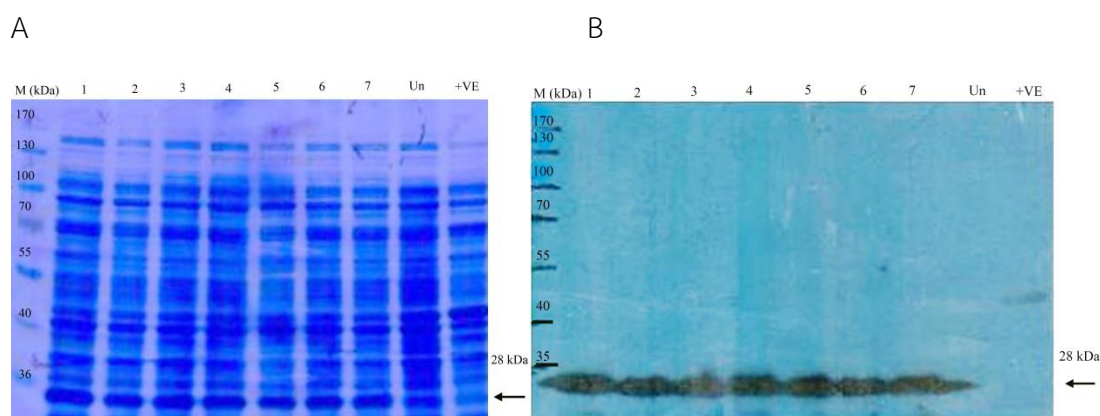
สอดคล้องกับผลจากวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ซึ่งพบแถบสัญญาณขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน (kDa) เมื่อใช้ระยะเวลาในการชักนำทั้ง 4 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน และพบว่าแถบสัญญาณมีความเข้มมากที่สุดเมื่อใช้ระยะเวลาในการชักนำที่ 3 ชั่วโมง (รูปที่ 5.21B, 3h) จากการทดลองนี้จึงเลือกใช้ระยะเวลาในการชักนำที่ 3 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้ชักนำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ มีการแสดงออกได้เหมาะสมที่สุดโดยมีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ มากสุด เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาอื่นๆ

จากการศึกษานี้จึงได้รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 - $\Delta 60N_VP1$ โคลนที่ 3 ซึ่งมีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ที่มีคุณสมบัติไม่ละลายอยู่โดยสามารถแสดงออกได้เหมาะสมที่สุด เมื่อใช้ความเข้มข้น IPTG 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25° ซ ระยะเวลา 3 ชั่วโมง



5.2.2 ผลการแสดงผลการออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2

จากผลการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนที่สามารถสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 พบว่ารีคอมบิแนนท์โคลนที่ถูกคัดเลือกทั้ง 7 โคลน ภายหลังจากชักนำด้วย IPTG แล้วสามารถแสดงออกรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 ได้ทุกโคลน โดยพบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตัน (kDa) มีปริมาณเพิ่มขึ้น (รูปที่ 5.22A, เลน 1-7) เมื่อเปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28 เปล่า (รูปที่ 5.22A, เลน Un) ซึ่งขนาดที่เพิ่มขึ้นนั้นเป็นขนาดเดียวกับขนาดที่ประมาณการไว้จากลำดับกรดอะมิโน

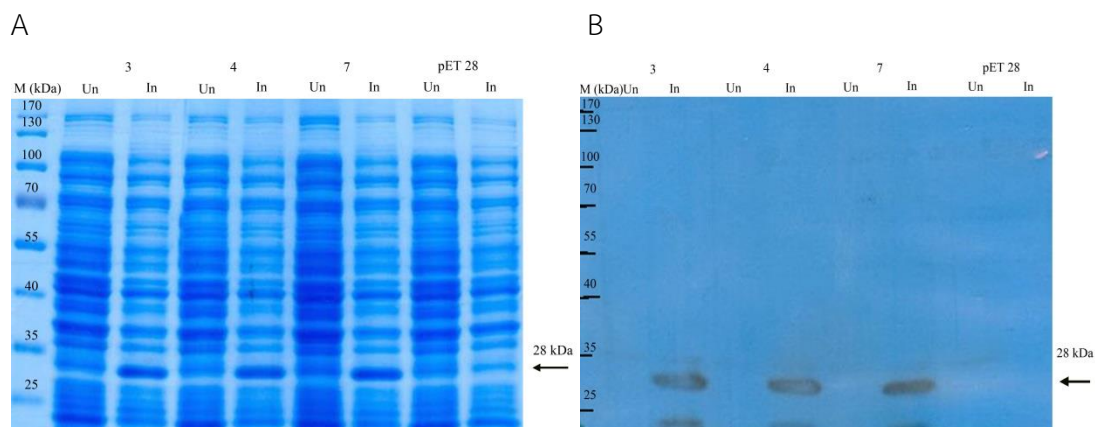


รูปที่ 5.22 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E. coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28-VP2 จำนวน 7 โคลน ที่ถูกชักนำด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG ที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

- | | |
|-----------|--|
| เลน M | Protein Marker (Fermentas, U.S.A) |
| เลน 1 – 7 | รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 –VP2 โคลนที่ 1 – 7 ตามลำดับ |
| เลน Un | รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 ที่ไม่มีการชักนำด้วย IPTG |
| เลน +VE | รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 –IHHNV ที่มีการชักนำด้วย IPTG |

นอกจากนี้ผลจากการตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วยวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 ซึ่งมี His₆ Tag และใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิดอื่นที่มี His₆ Tag เช่นเดียวกัน (รูปที่ 5.22B, เลน +VE) เป็นตัวควบคุมบวก พบแถบสัญญาณปรากฏที่ขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตัน (kDa) ทั้ง 7 เลน (รูปที่ 5.22B, เลน 1-7) จึงยืนยันได้ว่ารีคอมบิแนนท์โคลนทั้ง 7 โคลน สามารถชักนำให้มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 ขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตันได้ จึงคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนมา จำนวน 3 โคลน ดังนี้คือ 3, 4 และ 7 ไปทำการแสดงออกของโปรตีนโดยใช้สภาวะการชักนำ

เช่นเดิม ผลพบว่ารีคอมบิแนนท์โคลนทั้ง 3 โคลน มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 ขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตันในระดับเท่ากัน (รูปที่ 5.23A และ 5.23B) ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้เลือกรีคอมบิแนนท์โคลนที่ 4 สำหรับนำไปใช้ทดลองในขั้นต่อไป



รูปที่ 5.23 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E. coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -VP2 จำนวน 3 โคลน ที่ถูกชักนำด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG ที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

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

เลน Un ไม่มีการชักนำด้วย IPTG

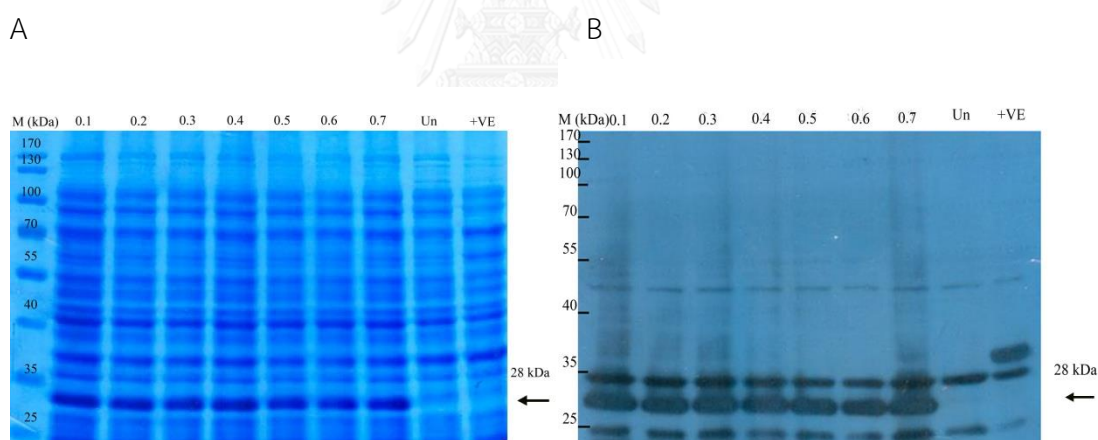
เลน In มีการชักนำด้วย IPTG

เลน +VE รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -IHNV ที่มีการชักนำด้วย IPTG

3, 4 และ 7 รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -VP2 โคลนที่ 3, 4 และ 7 ตามลำดับ

pET 28 รีคอมบิแนนท์โคลน pET28

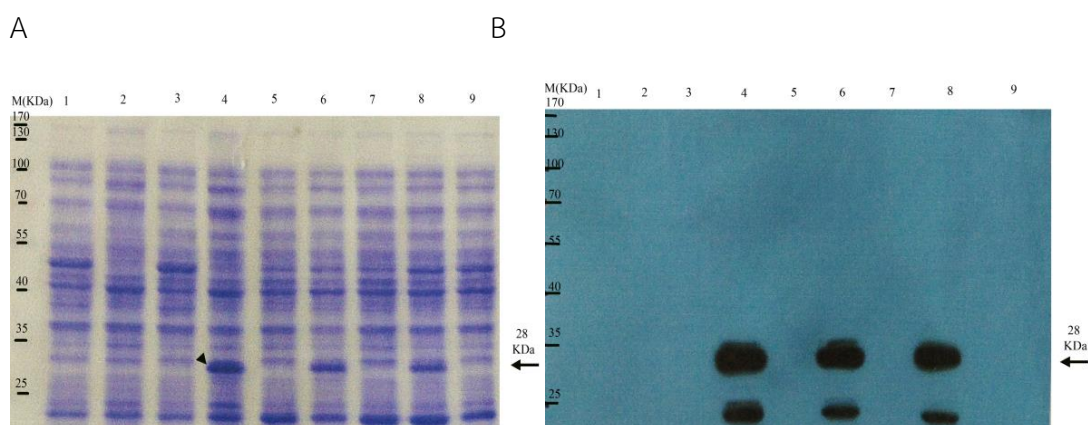
หลังจากนั้นจึงได้นำรีคอมบิแนนท์โคลนที่ 4 มาศึกษาการแปรผันปริมาณ IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายที่ใช้ชักนำให้มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ตั้งแต่ 0.1 – 0.7 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบกับเมื่อไม่ได้ชักนำด้วย IPTG พบว่าความเข้มข้นของ IPTG สุดท้ายทั้ง 7 ระดับ สามารถชักนำการแสดงออกรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 ได้ โดยพบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตัน (kDa) มีปริมาณเพิ่มขึ้นในทุกเลน (รูปที่ 5.24A, เลน 1-7) เมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อไม่ได้ชักนำด้วย IPTG (รูปที่ 5.24A, เลน Un) สอดคล้องกับผลของวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 และใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิดอื่นที่มี His₆ Tag เช่นเดียวกัน (รูปที่ 5.24A, เลน +VE) เป็นตัวควบคุมบวก พบแถบสัญญาณขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตัน (kDa) ในทุกเลน (รูปที่ 5.24B, เลน 0.1-0.7) จึงยืนยันได้ว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 พบที่ขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตัน (kDa) และพบระดับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 ใกล้เคียงกันเมื่อใช้ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของ IPTG ทั้ง 7 ระดับ แต่เมื่อใช้ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของ IPTG 0.2 มิลลิโมลาร์ สามารถชักนำให้รีคอมบิแนนท์โคลนให้มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 ได้ในระดับสูงกว่าเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อใช้ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของ IPTG อื่นๆ อีก 6 ระดับ



รูปที่ 5.24 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E. coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -VP2 โคลนที่ 4 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

- | | |
|-----------|--|
| เลน M | Protein Marker (Fermentas, U.S.A) |
| เลน Un | ไม่มีการชักนำด้วย IPTG |
| เลน +VE | รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -IHNV ที่มีการชักนำด้วย IPTG |
| 0.1 – 0.7 | รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -VP2 โคลนที่ 4 ถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 – 0.7 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ |

ในการทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับแสดงออกรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 จึงได้นำรีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -VP2 โคลนที่ 4 มาชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนด้วยความเข้มข้นสุดท้ายของ IPTG 0.2 มิลลิโมลาร์ โดยใช้อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้คือ 16° ซ, 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ พบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตัน (kDa) มีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อใช้อุณหภูมิที่ 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ (รูปที่ 5.25A, เลน 2, 4, 6 และ 8) ในขณะที่อุณหภูมิ 16° ซ ไม่พบการเพิ่มขึ้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 (รูปที่ 5.25A, เลน 2) โดยเปรียบเทียบกับเมื่อไม่ได้ชักนำด้วย IPTG (รูปที่ 5.25A, เลน 1, 3, 5 และ 7)



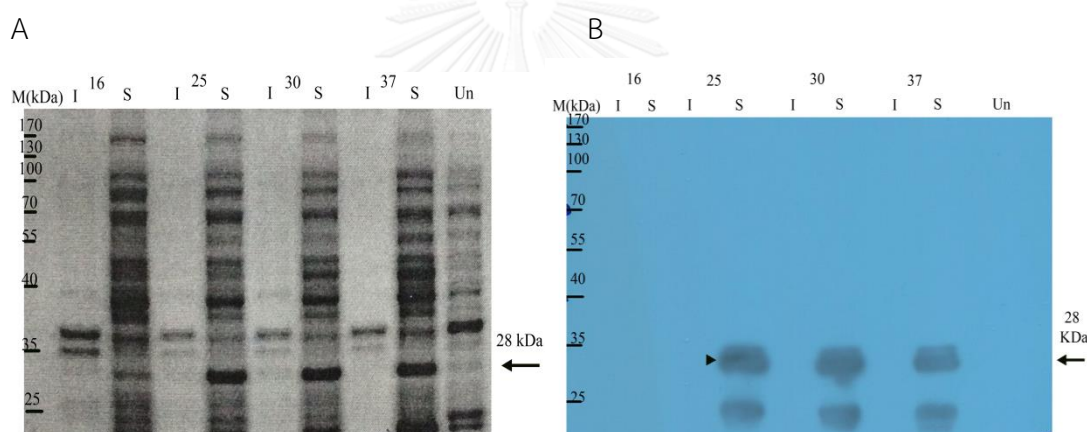
รูปที่ 5.25 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E. coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -VP2 โคลนที่ 4 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิต่างๆ

เลน M	Protein Marker (Fermentas, U.S.A)
เลน 1, 3, 5, 7	ไม่มีการชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 16° ซ, 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ ตามลำดับ
เลน 2, 4, 6, 8	มีการชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 16° ซ, 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ ตามลำดับ
เลน 9	รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 ที่มีการชักนำด้วย IPTG

สอดคล้องกับผลของวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 และใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิดอื่นที่มี His₆ Tag เช่นเดียวกัน (รูปที่ 5.25B, เลน 9) เป็นตัวควบคุมบวก พบแถบสัญญาณขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตัน (kDa) ที่อุณหภูมิ 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ (รูปที่ 5.25B, เลน 4, 6 และ 8) ในขณะที่อุณหภูมิ 16° ซ ไม่พบแถบสัญญาณที่ขนาดดังกล่าว (รูปที่ 5.25B, เลน 2) จากผลการทดลองแสดงว่าที่อุณหภูมิ 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 เกิดขึ้น และพบการย่อยของโปรตีนบางส่วนโดยสังเกตได้จากแถบสัญญาณที่เกิดขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 เมื่อใช้อุณหภูมิทั้ง 3 อุณหภูมินี้ พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 สามารถแสดงออกได้ในระดับที่เหมาะสมที่สุดเมื่อใช้อุณหภูมิ 25° ซ โดยมีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อใช้อุณหภูมิ 30° ซ และ 37° ซ



เมื่อนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 ซึ่งแสดงออกที่อุณหภูมิต่างๆ ทั้ง 4 อุณหภูมิ มาทดสอบคุณสมบัติการละลายของโปรตีนพบแถบรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 ขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตัน (kDa) ที่อุณหภูมิ 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ อยู่ในส่วนที่ละลายทั้งหมด ในขณะที่อุณหภูมิ 16° ซ ไม่พบแถบรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 ที่ขนาดดังกล่าวทั้งในส่วนที่ละลายและไม่ละลาย (รูปที่ 5.26A) สอดคล้องกับผลการทดสอบด้วยวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His Tag Antibody เป็น แอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 พบแถบสัญญาณขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตัน (kDa) ที่อุณหภูมิ 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ ในส่วนที่ละลายและพบการย่อยของโปรตีนบางส่วนโดยสังเกตได้จากแถบสัญญาณที่เกิดขึ้นทั้งสามอุณหภูมิแต่ในส่วนที่ไม่ละลายไม่พบแถบสัญญาณใดๆปรากฏ ในขณะที่อุณหภูมิ 16° ซ ซึ่งไม่พบแถบสัญญาณใดๆ ที่ขนาดดังกล่าวเกิดขึ้นในทั้งสองส่วน (รูปที่ 5.26B) จากผลการทดลองนี้จึงทำการเลือกอุณหภูมิ 25° ซ เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 ซึ่งมีคุณสมบัติละลาย



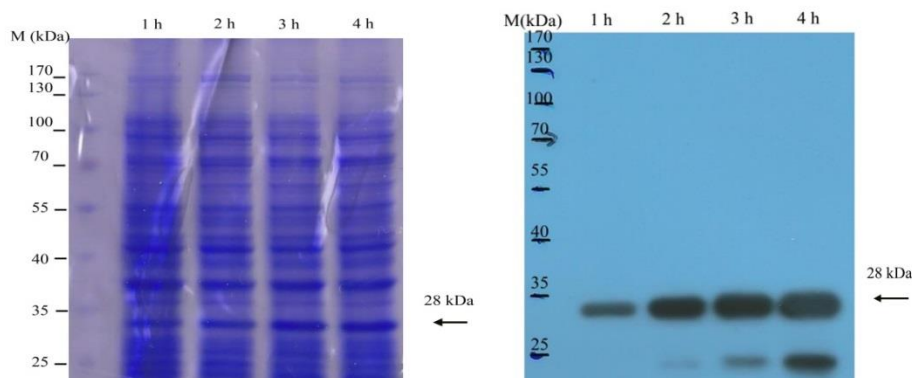
รูปที่ 5.26 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของการทดสอบคุณสมบัติการละลายของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E.coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -VP2 โคลนที่ 4 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิต่างๆ

เลน M	Protein Marker (Fermentas, U.S.A)
เลน I	ส่วนที่ไม่ละลาย (Inclusion bodies)
เลน S	ส่วนที่ละลาย (Supernatant)
เลน Un	รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 ที่ไม่มีการชักนำด้วย IPTG
16, 25, 30, 37	อุณหภูมิ 16° ซ, 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ ที่ใช้ชักนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ตามลำดับ

ในการทดลองสุดท้ายจึงได้หาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 จึงได้นำรีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -VP2 โคลนที่ 4 มาชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน ด้วยความเข้มข้นสุดท้ายของ IPTG 0.2 มิลลิโมลาร์ และใช้อุณหภูมิ 25° ซ โดยใช้เวลาในการชักนำให้มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 ต่างๆ ดังนี้คือ 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง พบแถบรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 ขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตัน (kDa) มีปริมาณเพิ่มขึ้นในทุกเลนทั้ง 4 ชั่วโมง (รูปที่ 5.27A, เลน 1h – 4h) โดยพบรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 มีการแสดงออกสูงสุดที่ใกล้เคียงกันเมื่อใช้ระยะเวลาในการชักนำที่ 3 และ 4 ชั่วโมง สอดคล้องกับผลจากวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 ซึ่งพบแถบสัญญาณขนาดประมาณ 28 กิโลดาลตัน (kDa) เมื่อใช้ระยะเวลาในการชักนำทั้ง 4 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน และพบว่าแถบสัญญาณมีความเข้มมากที่สุดเมื่อใช้ระยะเวลาในการชักนำที่ 3 และ 4 ชั่วโมง แต่ในชั่วโมงที่ 3 พบโปรตีนถูกย่อยน้อยกว่า (รูปที่ 5.27B, 3h และ 4h) จากการทดลองนี้จึงเลือกใช้ระยะเวลาในการชักนำที่ 3 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้ชักนำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 มีการแสดงออกได้เหมาะสมที่สุดโดยมีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาอื่นๆ

A

B



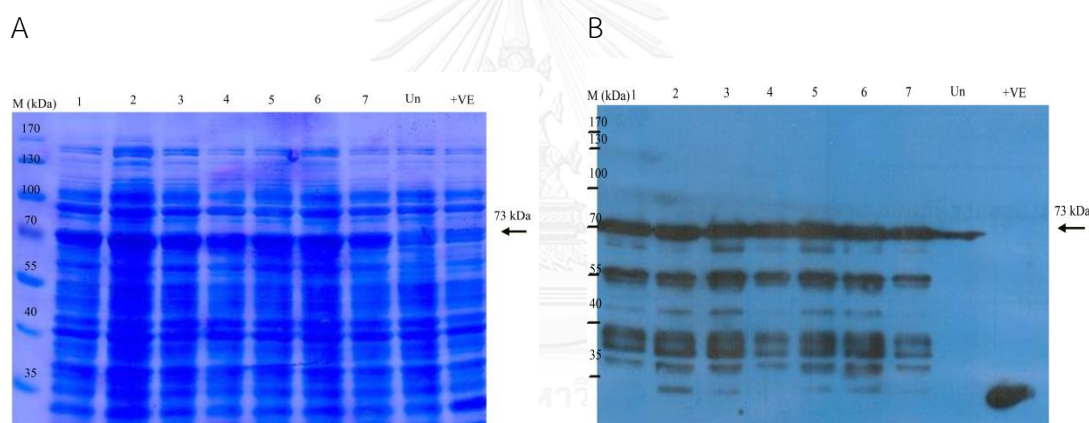
รูปที่ 5.27 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E.coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -VP2 โคลนที่ 4 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25° ซ เมื่อใช้ระยะเวลาในการชักนำต่างๆ

เลน M	Protein Marker (Fermentas, U.S.A)
เลน 1 h – 4 h	ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ซึ่งใช้ชักนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ตามลำดับ

จากการศึกษาข้างต้นจึงได้รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -VP2 โคลนที่ 4 ซึ่งมีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 ที่มีคุณสมบัติในการละลายโดยสามารถแสดงออกได้เหมาะสมที่สุด เมื่อใช้ความเข้มข้น IPTG 0.2 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25° ซ ระยะเวลา 3 ชั่วโมง

5.2.3 ผลการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1

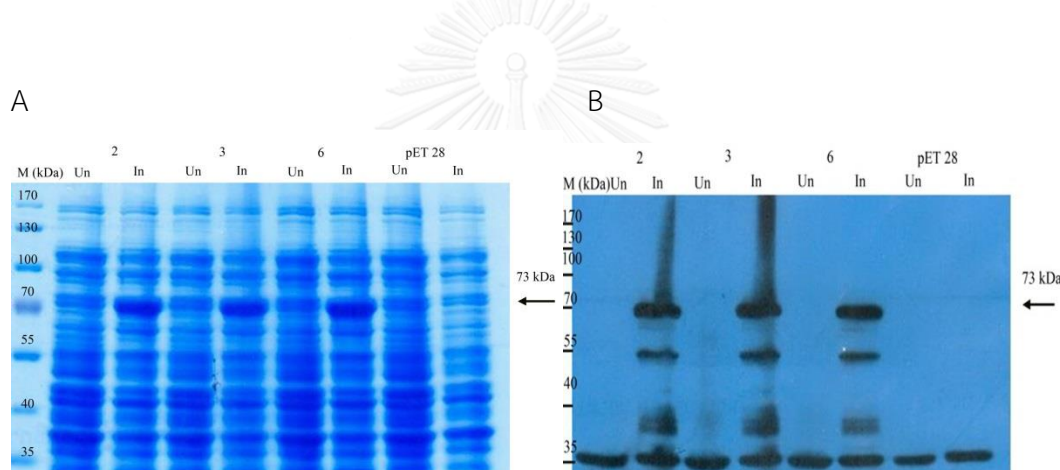
จากผลการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนที่สามารถสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 พบว่ารีคอมบิแนนท์โคลนที่ถูกคัดเลือกทั้ง 7 โคลน ภายหลังจากชักนำด้วย IPTG สามารถแสดงออกรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 ได้ทุกโคลน โดยพบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 73 กิโลดาลตัน (kDa) มีปริมาณเพิ่มขึ้น (รูปที่ 5.28A, เลน 1-7) เมื่อเปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์ที่มีพลาสมิด pET28 เปล่า (รูปที่ 5.28A, เลน Un) ซึ่งขนาดที่เพิ่มขึ้นนั้นเป็นขนาดเดียวกับขนาดที่ประมาณการไว้จากลำดับกรดอะมิโน



รูปที่ 5.28 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E.coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -VP2/ Δ 60N_VP1 จำนวน 7 โคลนที่ถูกชักนำด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG ที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

- | | |
|-----------|---|
| เลน M | Protein Marker (Fermentas, U.S.A) |
| เลน 1 - 7 | รีคอมบิแนนท์โคลน pET28-VP2/ Δ 60N_VP1 โคลนที่ 1 - 7 ตามลำดับ |
| เลน Un | รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 ที่ไม่มีการชักนำด้วย IPTG |
| เลน +VE | รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -IHNV ที่มีการชักนำด้วย IPTG |

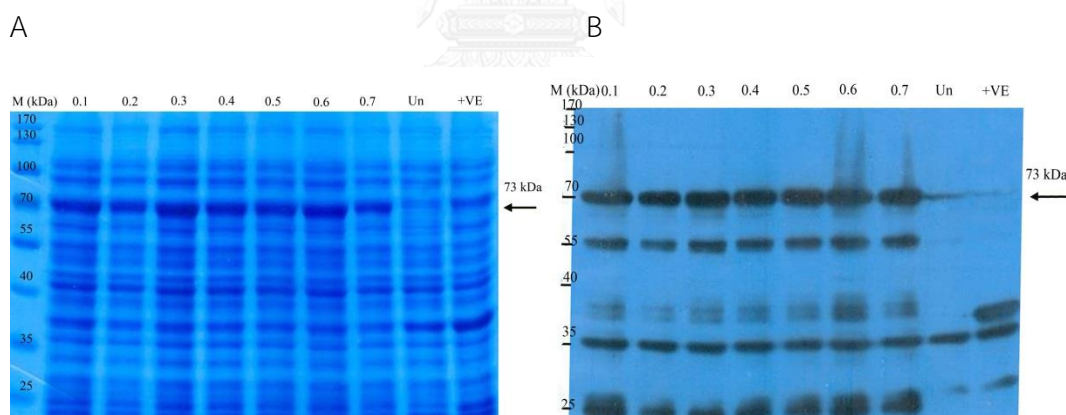
นอกจากนี้ผลจากการตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วยวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 ซึ่งมี His₆ Tag และใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิดอื่นที่มี His₆ Tag เช่นเดียวกัน (รูปที่ 5.28B, เลน +VE) เป็นตัวควบคุมบวก พบแถบสัญญาณปรากฏที่ขนาดประมาณ 73 กิโลดาลตัน (kDa) ทั้ง 7 เลน (รูปที่ 5.28B, เลน 1-7) จึงยืนยันได้ว่ารีคอมบิแนนท์โคลนทั้ง 7 โคลน สามารถถูกชักนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 ขนาดประมาณ 73 กิโลดาลตันได้ จึงคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนมา จำนวน 3 โคลน ดังนี้คือ 2, 3 และ 6 ไปทำการแสดงออกของโปรตีนโดยใช้สภาวะการชักนำเช่นเดิม ผลพบว่ารีคอมบิแนนท์โคลนทั้ง 3 โคลน มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 ขนาดประมาณ 73 กิโลดาลตัน ในระดับใกล้เคียงกัน (รูปที่ 5.29A และ 5.29B) ในการศึกษาจึงได้เลือกรีคอมบิแนนท์โคลนที่ 2 สำหรับนำไปใช้ทดลองในขั้นต่อไป



รูปที่ 5.29 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E. coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -VP2 จำนวน 3 โคลน ที่ถูกชักนำด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG ที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

- | | |
|------------|---|
| เลน M | Protein Marker (Fermentas, U.S.A) |
| เลน Un | ไม่มีการชักนำด้วย IPTG |
| เลน In | มีการชักนำด้วย IPTG |
| เลน +VE | รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -IHHNV |
| 2, 3 และ 6 | รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -VP2/ Δ 60N_VP1 โคลนที่ 2, 3 และ 6 ตามลำดับ |
| pET 28 | รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 |

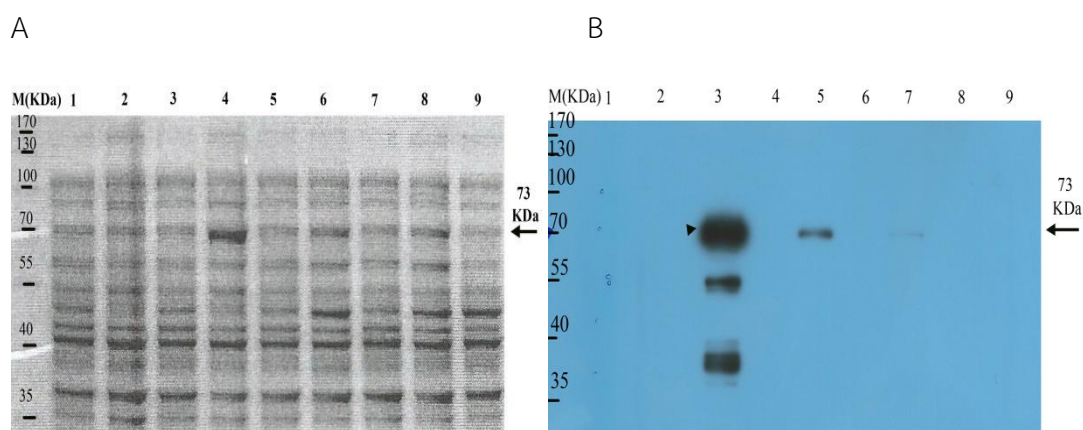
หลังจากนั้นจึงได้นำรีคอมบิแนนท์โคลนที่ 2 มาศึกษาการแปรผันความเข้มข้นสุดท้ายของ IPTG ที่ใช้ชักนำให้มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ตั้งแต่ 0.1 – 0.7 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบกับเมื่อไม่ได้ชักนำด้วย IPTG พบว่าความเข้มข้นของ IPTG สุดท้ายทั้ง 7 ระดับ สามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 ได้ โดยพบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 73 กิโลดาลตัน (kDa) มีปริมาณเพิ่มขึ้นในทุกเลน (รูปที่ 5.30A, เลน 1-7) เมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อไม่ได้ชักนำด้วย IPTG (รูปที่ 5.30 A, เลน Un) ซึ่งสอดคล้องกับผลของวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 และใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิดอื่นที่มี His₆ Tag เช่นเดียวกัน (รูปที่ 5.30B, เลน +VE) เป็นตัวควบคุมบวก พบแถบสัญญาณขนาดประมาณ 73 กิโลดาลตัน (kDa) ในทุกเลน (รูปที่ 5.30B, เลน 1-7) จึงยืนยันได้ว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 พบได้ที่ขนาดประมาณ 73 กิโลดาลตัน (kDa) โดยที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของ IPTG ที่ 0.3 และ 0.6 มิลลิโมลาร์ สามารถชักนำให้รีคอมบิแนนท์โคลนมีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 ได้ในระดับสูงเมื่อเปรียบเทียบกับที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของ IPTG อื่นๆ อีก 5 ระดับ แต่การศึกษานี้ได้เลือกระดับความเข้มข้นสุดท้ายของ IPTG ที่ 0.3 มิลลิโมลาร์ เป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยพบการย่อยของโปรตีนน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของ IPTG ที่ 0.6 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 5.28 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E.coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28-VP2/ Δ 60N_VP1 โคลนที่ 2 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

เลน M	Protein Marker (Fermentas, U.S.A)
เลน Un	ไม่มีการชักนำด้วย IPTG
เลน +VE	รีคอมบิแนนท์โคลน pET28-IHHNV ที่มีการชักนำด้วย IPTG
0.1 – 0.7	รีคอมบิแนนท์โคลน pET28-VP2/ Δ 60N_VP1 โคลนที่ 2 ถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 – 0.7 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ

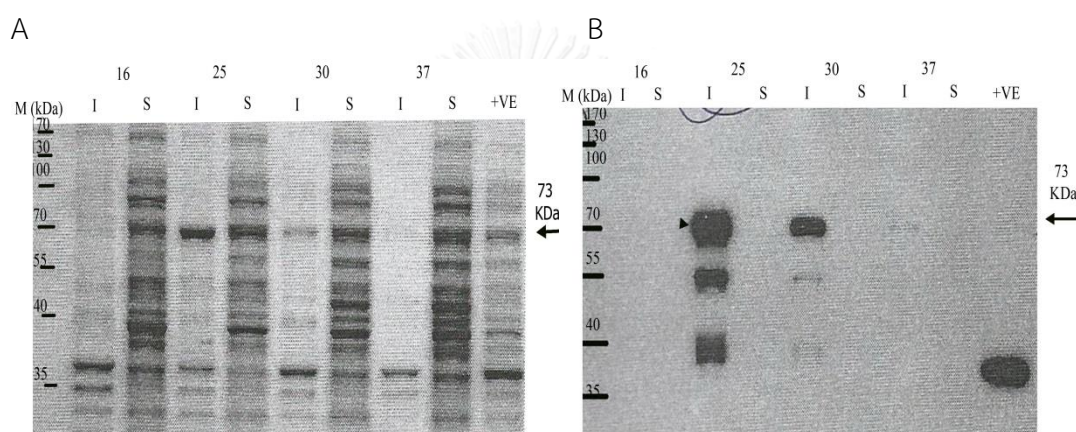
ในการทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 จึงได้นำรีคอมบิแนนท์โคลน pET28-VP2/ Δ 60N_VP1 โคลนที่ 2 มาชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนด้วยความเข้มข้นสุดท้ายของ IPTG 0.3 มิลลิโมลาร์ โดยใช้อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้คือ 16° ซ, 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ พบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 73 กิโลดาลตัน (kDa) มีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อใช้อุณหภูมิที่ 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ (รูปที่ 5.31A, เลน 2, 4, 6 และ 8) ในขณะที่อุณหภูมิ 16° ซ ไม่พบการเพิ่มขึ้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 (รูปที่ 5.31A, เลน 2) โดยเปรียบเทียบกับเมื่อไม่ได้ชักนำด้วย IPTG (รูปที่ 5.31A, เลน 1, 3, 5 และ 7)



รูปที่ 5.29 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E. coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -VP2/ Δ 60N_VP1 โคลนที่ 2 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิต่างๆ

เลน M	Protein Marker (Fermentas, U.S.A)
เลน 1, 3, 5, 7	ไม่มีการชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 16° ซ, 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ ตามลำดับ
เลน 2, 4, 6, 8	มีการชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 16° ซ, 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ ตามลำดับ
เลน 9	รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 ที่มีการชักนำด้วย IPTG

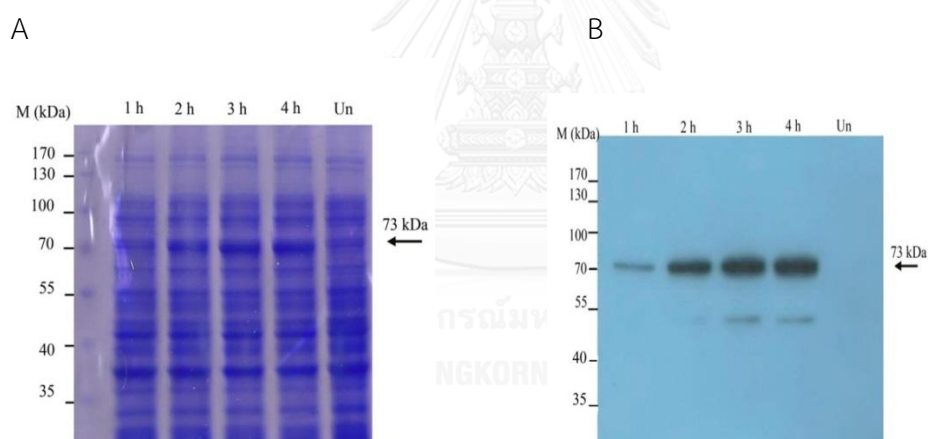
สอดคล้องกับผลของวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 และใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิดอื่นที่มี His₆ Tag เช่นเดียวกัน (รูปที่ 5.31B, เลน +VE) เป็นตัวควบคุมบวก พบแถบสัญญาณขนาดประมาณ 73 กิโลดาลตัน (kDa) ที่อุณหภูมิ 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ (รูปที่ 5.31B, เลน 4, 6 และ 8) ในขณะที่อุณหภูมิ 16° ซ ไม่พบแถบสัญญาณที่ขนาดดังกล่าว (รูปที่ 5.31B, เลน 2) จากผลการทดลองแสดงว่าที่อุณหภูมิ 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 เกิดขึ้น โดยพบระดับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 สูงสุดเมื่อใช้อุณหภูมิ 25° ซ และลดลงเมื่อใช้อุณหภูมิ 30° ซ และ 37° ซ ตามลำดับ แต่พบการย่อยของโปรตีนสูงสุดเมื่อใช้อุณหภูมิ 25° ซ เช่นกัน



รูปที่ 5.30 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของการทดสอบคุณสมบัติการละลายของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E.coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28-VP2/ Δ 60N_VP1 โคลนที่ 2 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิต่างๆ

เลน M	Protein Marker (Fermentas, U.S.A)
เลน I	ส่วนที่ไม่ละลาย (Inclusion bodies)
เลน S	ส่วนที่ละลาย (Supernatant)
เลน +VE	รีคอมบิแนนท์โคลน pET28-IHHNV ที่มีการชักนำด้วย IPTG
16, 25, 30, 37	อุณหภูมิ 16° ซ, 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ ที่ใช้ชักนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ตามลำดับ

เมื่อนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 ซึ่งแสดงออกที่อุณหภูมิต่างๆ ทั้ง 4 อุณหภูมิ มาทดสอบคุณสมบัติการละลายของโปรตีนพบแถบรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 ขนาดประมาณ 73 กิโลดาลตัน (kDa) ที่อุณหภูมิ 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ อยู่ในส่วนที่ไม่ละลาย ในขณะที่อุณหภูมิ 16° ซ ไม่พบแถบรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 ที่ขนาดดังกล่าวทั้งในส่วนที่ละลายและไม่ละลาย (รูปที่ 5.32A) สอดคล้องกับผลการทดสอบด้วยวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 และใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิดอื่นที่มี His₆ Tag เช่นเดียวกันเป็นตัวควบคุมบวก พบแถบสัญญาณขนาดประมาณ 73 กิโลดาลตัน (kDa) ที่อุณหภูมิ 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ อยู่ในส่วนที่ไม่ละลายและมีความเข้มของแถบสัญญาณที่ขนาด 73 กิโลดาลตัน (kDa) ลดลง ตามลำดับอีกทั้งพบการย่อยของโปรตีนเกิดขึ้นโดยสังเกตได้จากแถบสัญญาณที่อุณหภูมิ 25° ซ และ 30° ซ (รูปที่ 5.32B) แต่ในส่วนที่ละลายไม่พบแถบสัญญาณใดๆ ปรากฏ ในขณะที่อุณหภูมิ 16° ซ ซึ่งไม่พบแถบสัญญาณใดๆ ที่ขนาดดังกล่าวเกิดขึ้นในทั้งสองส่วน



รูปที่ 5.31 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E.coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -VP2/ Δ 60N_VP1 โคลนที่ 2 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25° ซ เมื่อใช้ระยะเวลาในการชักนำต่างๆ

เลน M	Protein Marker (Fermentas, U.S.A)
เลน 1 h – 4 h	ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ซึ่งใช้ชักนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ตามลำดับ
เลน Un	ไม่มีการชักนำด้วย IPTG

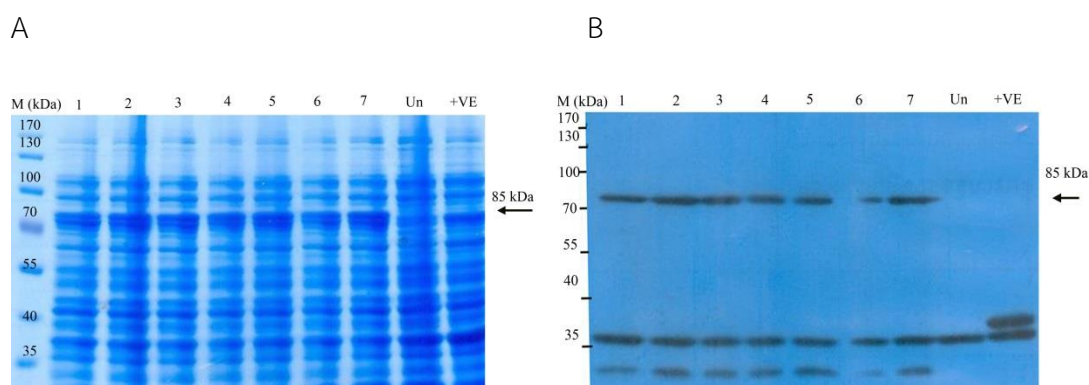
จากผลการทดลองนี้จึงทำการเลือกอุณหภูมิ 25° ซ เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ละลาย

ในการทดลองสุดท้ายจึงได้หาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 จึงได้นำรีคอมบิแนนท์โคลน pET28-VP2/ Δ 60N_VP1 โคลนที่ 2 มาชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนด้วยความเข้มข้นสุดท้ายของ IPTG 0.3 มิลลิโมลาร์ และใช้อุณหภูมิ 25° ซ โดยใช้ระยะเวลาในการชักนำให้มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 ต่างๆ ดังนี้คือ 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง พบแถบรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 ขนาดประมาณ 73 กิโลดาลตัน (kDa) มีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อไม่ได้ชักนำด้วย IPTG (รูปที่ 5.33A, เลน Un) ในทุกเลนทั้ง 4 ชั่วโมง (รูปที่ 5.33A, เลน 1h - 4h) โดยพบรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 มีการแสดงออกสูงสุดเมื่อใช้ระยะเวลาในการชักนำที่ 3 และ 4 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกัน สอดคล้องกับผลจากวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 ซึ่งพบแถบสัญญาณขนาดประมาณ 73 กิโลดาลตัน (kDa) เมื่อใช้ระยะเวลาในการชักนำทั้ง 4 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน และพบว่าแถบสัญญาณมีความเข้มมากที่สุดเมื่อใช้ระยะเวลาในการชักนำที่ 3 และ 4 ชั่วโมง (รูปที่ 5.33B, 3h และ 4h) จากการทดลองนี้จึงเลือกใช้ระยะเวลาในการชักนำที่ 3 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้ชักนำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 มีการแสดงออกได้อย่างเหมาะสม

จากการศึกษาครั้งนี้จึงได้รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -VP2/ Δ 60N_VP1 โคลนที่ 2 ซึ่งมีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 ที่มีคุณสมบัติไม่ละลายโดยสามารถแสดงออกได้เหมาะสมที่สุด เมื่อใช้ความเข้มข้น IPTG 0.3 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25° ซ ระยะเวลา 3 ชั่วโมง

5.2.4 ผลการแสดงผลของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$

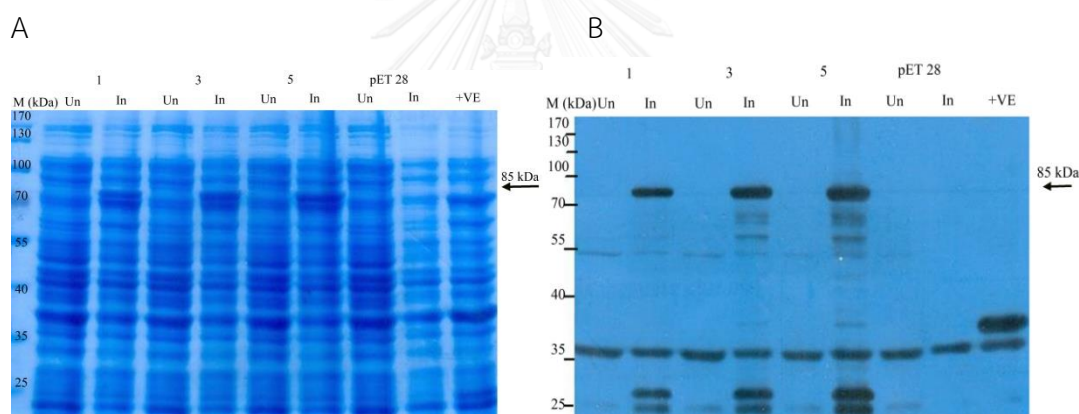
จากผลการคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนที่สามารถสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ พบว่ารีคอมบิแนนท์โคลนที่ถูกคัดเลือกทั้ง 7 โคลน ภายหลังจากชักนำด้วย IPTG แล้ว สามารถแสดงออกรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ ได้ทุกโคลน โดยพบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 85 กิโลดาลตัน (kDa) มีปริมาณเพิ่มขึ้น (รูปที่ 5.34A, เลข 1-7) เมื่อเปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์ที่มีพลาสมิด pET28 เปล่า (รูปที่ 5.34A, เลข Un)



รูปที่ 5.32 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E. coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 - $\Delta 60N_VP1/VP2$ จำนวน 7 โคลน ที่ถูกชักนำด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG ที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

- | | |
|-----------|---|
| เลน M | Protein Marker (Fermentas, U.S.A) |
| เลน 1 – 7 | รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 - $\Delta 60N_VP1/VP2$ โคลนที่ 1 – 7 ตามลำดับ |
| เลน Un | รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 ที่ไม่มีการชักนำด้วย IPTG |
| เลน +VE | รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -IHNV ที่มีการชักนำด้วย IPTG |

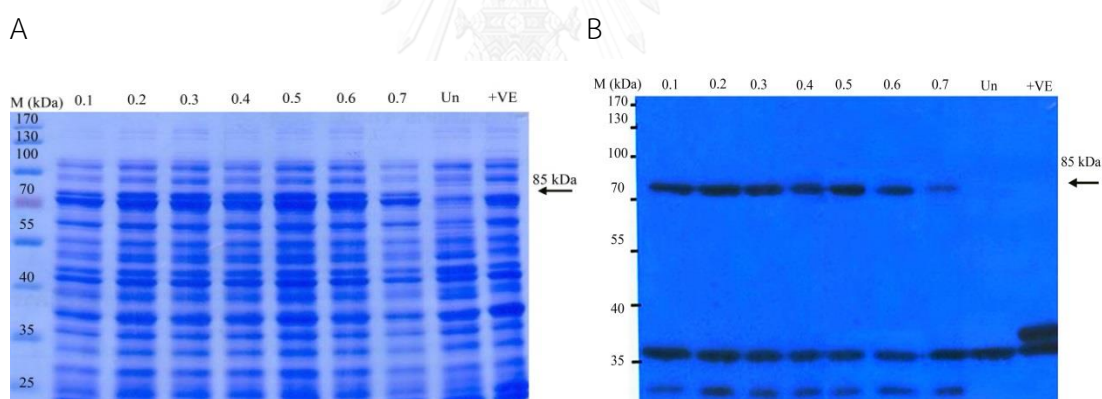
นอกจากนี้ผลจากการตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วยวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ ซึ่งมี His₆ Tag และใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิดอื่นที่มี His₆ Tag เช่นเดียวกัน (รูปที่ 5.35B, เลน +VE) เป็นตัวควบคุมบวก พบแถบสัญญาณปรากฏที่ขนาดประมาณ 85 กิโลดาลตัน (kDa) ทั้ง 7 เลน (รูปที่ 5.35B, เลน 1-7) จึงยืนยันได้ว่ารีคอมบิแนนท์โคลนทั้ง 7 โคลน ถูกชักนำให้มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ ขนาดประมาณ 85 กิโลดาลตัน จึงคัดเลือกรีคอมบิแนนท์โคลนมา จำนวน 3 โคลน ดังนี้คือ 1, 3 และ 5 ไปทำการแสดงออกของโปรตีนโดยใช้สภาวะการชักนำเช่นเดิม ผลพบว่ารีคอมบิแนนท์โคลนทั้ง 3 โคลน มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ ขนาดประมาณ 85 กิโลดาลตัน และพบรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ ถูกย่อยเพิ่มขึ้นตามระดับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนของโคลนที่ 1, 3 และ 5 ตามลำดับ ซึ่งในการศึกษานี้ได้เลือกรีคอมบิแนนท์โคลนที่ 3 เป็นรีคอมบิแนนท์โคลนที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการแสดงออกรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ (รูปที่ 5.35A และ 5.35B)



รูปที่ 5.33 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E. coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 - $\Delta 60N_VP1/VP2$ จำนวน 3 โคลน ที่ถูกชักนำด้วย 0.4 มิลลิโมลาร์ IPTG ที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

เลน M	Protein Marker (Fermentas, U.S.A)
เลน Un	ไม่มีการชักนำด้วย IPTG
เลน In	มีการชักนำด้วย IPTG
เลน +VE	รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -IHNV ที่มีการชักนำด้วย IPTG
2, 3 และ 6	รีคอมบิแนนท์โคลน pET28-VP2/ $\Delta 60N_VP1$ โคลนที่ 1, 3 และ 5 ตามลำดับ
pET 28	รีคอมบิแนนท์โคลน pET28

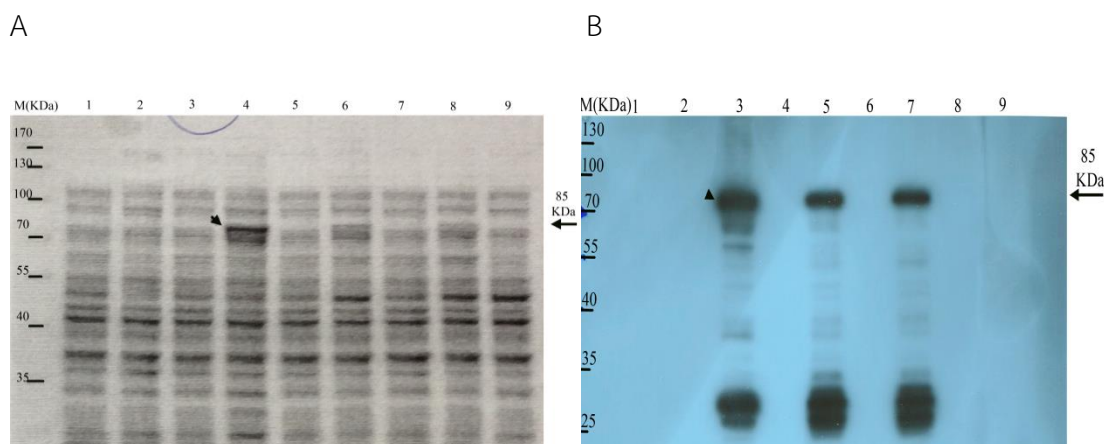
หลังจากนั้นจึงได้นำรีคอมบิแนนท์โคลนที่ 3 มาศึกษาการแปรผันปริมาณ IPTG ความเข้มข้นสุดท้ายที่ใช้ชักนำให้มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ตั้งแต่ 0.1 – 0.7 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบกับเมื่อไม่ได้ชักนำด้วย IPTG พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของ IPTG สุดท้ายทั้ง 7 ระดับ สามารถชักนำการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ ได้ โดยพบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 85 กิโลดาลตัน (kDa) มีปริมาณเพิ่มขึ้นในทุกเลน (รูปที่ 5.36A, เลน 1-7) เมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อไม่ได้ชักนำด้วย IPTG (รูปที่ 5.36A, เลน Un) สอดคล้องกับผลของวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ และใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิดอื่นที่มี His₆ Tag เช่นเดียวกัน (รูปที่ 5.36B, เลน +VE) เป็นตัวควบคุมบวก พบแถบสัญญาณขนาดประมาณ 85 กิโลดาลตัน (kDa) ในทุกเลน (รูปที่ 5.36B, เลน 1-7) จึงยืนยันได้ว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ พบได้ที่ขนาดประมาณ 85 กิโลดาลตัน (kDa) โดยระดับความเข้มข้นสุดท้ายของ IPTG ที่ 0.3 มิลลิโมลาร์ สามารถชักนำให้รีคอมบิแนนท์โคลนมีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ ได้ในระดับที่เหมาะสมที่สุดโดยมีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ มากสุด เมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อใช้ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของ IPTG อื่นๆ อีก 6 ระดับ



รูปที่ 5.34 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E. coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28- $\Delta 60N_VP1/VP2$ โคลนที่ 3 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

- | | |
|-----------|---|
| เลน M | Protein Marker (Fermentas, U.S.A) |
| เลน Un | ไม่มีการชักนำด้วย IPTG |
| เลน +VE | รีคอมบิแนนท์โคลน pET28-IHHNV ที่มีการชักนำด้วย IPTG |
| 0.1 – 0.7 | รีคอมบิแนนท์โคลน pET28- $\Delta 60N_VP1/VP2$ โคลนที่ 3 ถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 – 0.7 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ |

ในการทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ จึงได้นำรีคอมบิแนนท์โคลน pET28 - $\Delta 60N_VP1/VP2$ โคลนที่ 3 มาชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนด้วยความเข้มข้นสุดท้ายของ IPTG 0.3 มิลลิโมลาร์ โดยใช้อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้คือ 16° ซ, 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ พบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 85 กิโลดาลตัน (kDa) มีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อใช้อุณหภูมิที่ 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ (รูปที่ 5.37A, เลน 2, 4, 6 และ 8) ในขณะที่อุณหภูมิ 16° ซ ไม่พบการเพิ่มขึ้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ (รูปที่ 5.37A, เลน 2) โดยเปรียบเทียบกับเมื่อไม่ได้ชักนำด้วย IPTG (รูปที่ 5.37A, เลน 1, 3, 5 และ 7)



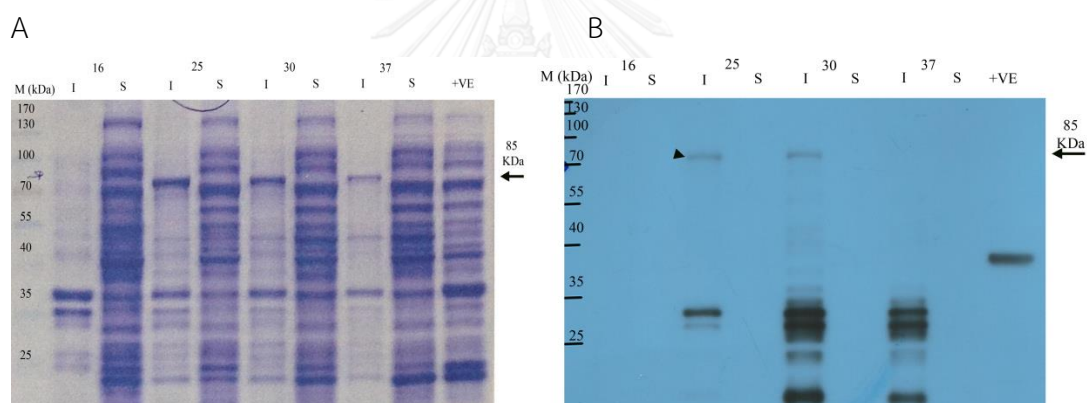
รูปที่ 5.35 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E. coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 - $\Delta 60N_VP1/VP2$ โคลนที่ 3 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิต่างๆ

เลน M	Protein Marker (Fermentas, U.S.A)
เลน 1, 3, 5, 7	ไม่มีการชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 16° ซ, 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ ตามลำดับ
เลน 2, 4, 6, 8	มีการชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 16° ซ, 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ ตามลำดับ
เลน 9	รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 ที่มีการชักนำด้วย IPTG

สอดคล้องกับผลของวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ และใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิดอื่นที่มี His₆ Tag เช่นเดียวกัน (รูปที่ 5.37B, เลข +VE) เป็นตัวควบคุมบวก พบแถบสัญญาณขนาดประมาณ 85 กิโลดาลตัน (kDa) ที่อุณหภูมิ 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ (รูปที่ 5.37B, เลข 4, 6 และ 8) ในขณะที่อุณหภูมิ 16° ซ ไม่พบแถบสัญญาณที่ขนาดดังกล่าว (รูปที่ 5.37B, เลข 2) จากผลการทดลองแสดงว่าที่อุณหภูมิ 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ เกิดขึ้น และพบการย่อยของโปรตีนบางส่วนโดยสังเกตได้จากแถบสัญญาณที่เกิดขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ เมื่อใช้อุณหภูมิทั้ง 3 อุณหภูมินี้ พบว่า รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ สามารถแสดงออกได้ในระดับที่เหมาะสมที่สุด เมื่อใช้อุณหภูมิ 25° ซ โดยมีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ มากสุด เมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อใช้อุณหภูมิ 30° ซ และ 37° ซ



เมื่อนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ ซึ่งแสดงออกที่อุณหภูมิต่างๆ ทั้ง 4 อุณหภูมิ มาทดสอบคุณสมบัติการละลายของโปรตีนพบแถบรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ ขนาดประมาณ 85 กิโลดาลตัน (kDa) ที่อุณหภูมิ 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ อยู่ในส่วนที่ไม่ละลาย ในขณะที่อุณหภูมิ 16° ซ ไม่พบแถบรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ ที่ขนาดดังกล่าวทั้งในส่วนที่ละลายและไม่ละลาย (รูปที่ 5.39A) สอดคล้องกับผลการทดสอบด้วยวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ และใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิดอื่นที่มี His₆ Tag เช่นเดียวกันเป็นตัวควบคุมบวก พบแถบสัญญาณขนาดประมาณ 85 กิโลดาลตัน (kDa) ที่อุณหภูมิ 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ ในส่วนที่ไม่ละลาย โดยพบการย่อยของโปรตีนเกิดขึ้นมากที่อุณหภูมิ 30° ซ และ 37° ซ ในขณะที่อุณหภูมิ 25° ซ พบการย่อยของโปรตีนเกิดขึ้นน้อย (รูปที่ 5.38B) ในขณะที่ส่วนที่ละลายไม่พบแถบสัญญาณใดๆ ปรากฏเช่นเดียวกับที่อุณหภูมิ 16° ซ ซึ่งไม่พบแถบสัญญาณใดๆ ที่ขนาดดังกล่าวเกิดขึ้นในทั้งสองส่วน

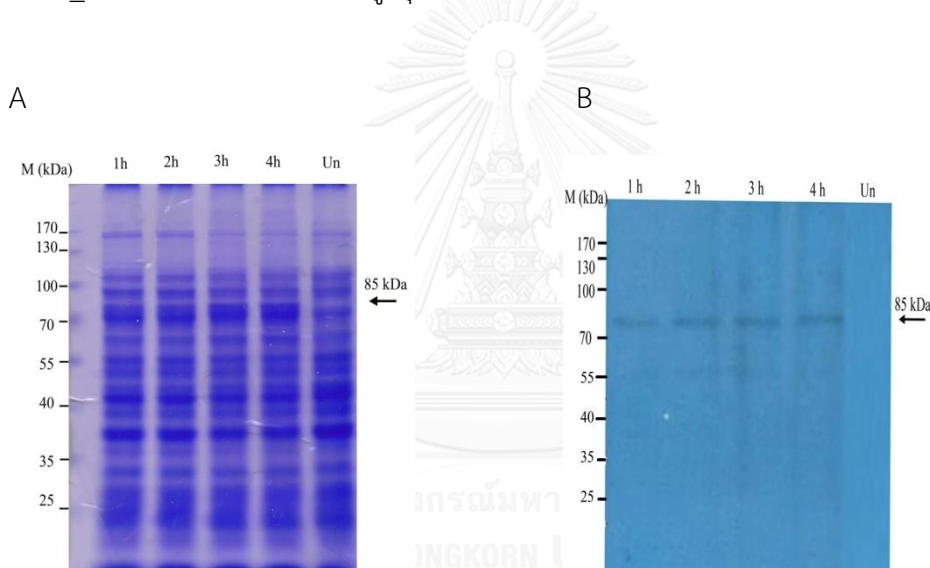


รูปที่ 5.38 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของการทดสอบคุณสมบัติการละลายของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E. coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28- $\Delta 60N_VP1/VP2$ โคลนที่ 3 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิต่างๆ

เลน M	Protein Marker (Fermentas, U.S.A)
เลน I	ส่วนที่ไม่ละลาย (Inclusion bodies)
เลน S	ส่วนที่ละลาย (Supernatant)
เลน +VE	รีคอมบิแนนท์โคลน pET28-IHHNV ที่มีการชักนำด้วย IPTG
16, 25, 30, 37	อุณหภูมิ 16° ซ, 25° ซ, 30° ซ และ 37° ซ ที่ใช้ชักนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ตามลำดับ

จากผลการทดลองนี้จึงทำการเลือกอุณหภูมิ 25° ซ เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ละลาย

ในการทดลองสุดท้ายจึงได้หาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ จึงได้นำรีคอมบิแนนท์โคลน pET28- $\Delta 60N_VP1/VP2$ โคลนที่ 3 มาชักนำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนด้วยความเข้มข้นสุดท้ายของ IPTG 0.3 มิลลิโมลาร์ และใช้อุณหภูมิ 25° ซ โดยใช้ระยะเวลาในการชักนำให้มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ ต่างๆ ดังนี้คือ 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง พบแถบรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ ขนาดประมาณ 85 กิโลดาลตัน (kDa) มีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อไม่ได้ชักนำด้วย IPTG (รูปที่ 5.39A, เลน Un) ในทุกเลนทั้ง 4 ชั่วโมง (รูปที่ 5.39A, เลน 1h– 4h) โดยพบรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ มีการแสดงออกสูงสุดเมื่อใช้ระยะเวลาในการชักนำที่ 3 และ 4 ชั่วโมงใกล้เคียงกัน



รูปที่ 5.39 SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของโปรตีนทั้งหมดของเซลล์ *E.coli* รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 - $\Delta 60N_VP1/VP2$ โคลนที่ 3 ซึ่งถูกชักนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25° ซ เมื่อใช้ระยะเวลาในการชักนำต่างๆ

เลน M	Protein Marker (Fermentas, U.S.A)
เลน 1 h – 4 h	ระยะเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ซึ่งใช้ชักนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ตามลำดับ
เลน Un	ไม่มีการชักนำด้วย IPTG

สอดคล้องกับผลจากวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti-His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ ซึ่งพบแถบสัญญาณขนาดประมาณ 85 กิโลดาลตัน (kDa) เมื่อใช้ระยะเวลาในการชักนำทั้ง 4 ชั่วโมง เช่นเดียวกัน และพบว่าแถบสัญญาณมีความเข้มมากที่สุด เมื่อใช้ระยะเวลาในการชักนำที่ 3 และ 4 ชั่วโมง (รูปที่ 5.39B, 3h) จากการทดลองนี้จึงเลือกใช้ระยะเวลาในการชักนำที่ 3 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการใช้ชักนำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ มีการแสดงออกที่เหมาะสม จากการศึกษาครั้งนี้จึงได้รีคอมบิแนนท์โคลน pET28- $\Delta 60N_VP1/VP2$ โคลนที่ 3 ซึ่งมีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ ที่มีคุณสมบัติไม่ละลายโดยสามารถแสดงออกได้เหมาะสมที่สุด เมื่อใช้ความเข้มข้น IPTG 0.3 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25° ซ ระยะเวลา 3 ชั่วโมง

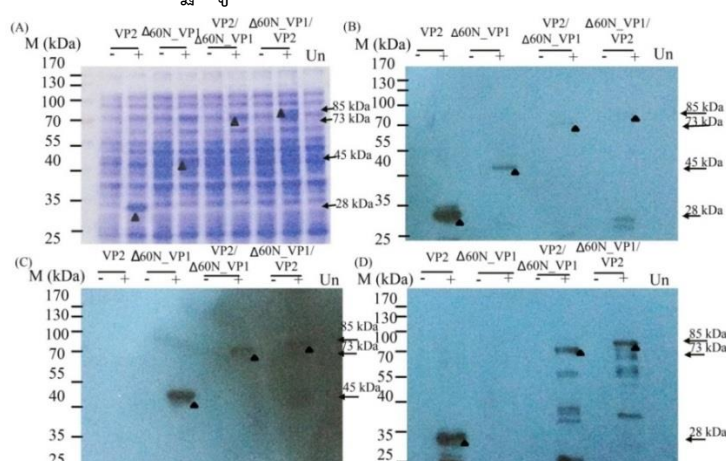
จากการทดลองทั้งหมดนี้ จึงสามารถสรุปรีคอมบิแนนท์โคลนที่เลือกนำมาใช้แสดงออกรีคอมบิแนนท์โปรตีน ตลอดจนสภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ได้แก่ ความเข้มข้นของ IPTG, อุณหภูมิ และระยะเวลาในการชักนำ เพื่อชักนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้เหมาะสมที่สุด รวมทั้งคุณสมบัติการละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ทั้ง 4 ชนิดตามตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 สรุปรีคอมบิแนนท์โคลนที่เลือกนำมาใช้, สภาวะที่เหมาะสมในการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน รวมทั้งคุณสมบัติการละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้ง 4 ชนิดที่แสดงออก

ที่	ชนิดของรีคอมบิแนนท์โปรตีน	รีคอมบิแนนท์โคลนที่ใช้	สภาวะที่ใช้ชักนำการแสดงออกของโปรตีน			คุณสมบัติการละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีน
			IPTG (มิลลิโมลาร์)	อุณหภูมิ (° ซ)	เวลา (ชม.)	
1	$\Delta 60N_VP1$	โคลนที่ 3	0.2	25	3	ไม่ละลาย
2	VP2	โคลนที่ 4	0.2	25	3	ละลาย
3	VP2/ $\Delta 60N_VP1$	โคลนที่ 2	0.3	25	3	ไม่ละลาย
4	$\Delta 60N_VP1/VP2$	โคลนที่ 3	0.3	25	3	ไม่ละลาย

5.2.5. ผลการยืนยันการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP1 และ VP2

ภายหลังจากชักนำให้รีคอมบิแนนท์โคลนมีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้ง 4 ชนิด ตามสภาวะที่เหมาะสม จึงนำโปรตีนมาทดสอบยืนยันผลการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนว่าเป็นโปรตีน VP1 และ VP2 ด้วยวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti-VP1 Polyclonal Antibody และ Anti-VP2 Polyclonal Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิและใช้ Anti-His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน ทั้ง 4 ชนิด ซึ่งมี His₆ Tag



รูปที่ 5.36 ผลการวิเคราะห์ SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) โดยใช้ Anti-His Tag Antibody (1:4,000) (B) Anti-VP1 Polyclonal Antibody (1:5,000) (C) Anti-VP2 Polyclonal Antibody (1:5,000) (D) ของการแสดงออกรีคอมบิแนนท์โปรตีนของรีคอมบิแนนท์โคลนที่เหมาะสมทั้ง 4 ชนิด ตามสภาวะที่เหมาะสมต่อการชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่เหมาะสม

เลน M	Protein Marker (Fermentas, U.S.A)
เลน -	ไม่มีการชักนำด้วย IPTG
เลน +	มีการชักนำด้วย IPTG
เลน Un	รีคอมบิแนนท์โคลน pET28 -IHNV ไม่มีการชักนำด้วย IPTG

จากผล SDS-PAGE พบแถบโปรตีนของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2, Δ60N_VP1, VP2/Δ60N_VP1 และ Δ60N_VP1/VP2 ปรากฏที่ขนาด 28, 45, 73 และ 85 กิโลดาลตัน (kDa) โดยมีปริมาณเพิ่มขึ้น (รูปที่ 5.40A, เลน 2, 4, 6 และ 8) เมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อไม่ได้ชักนำด้วย IPTG (รูปที่ 5.40A, เลน 1, 3, 5 และ 7) สอดคล้องกับผล Western blotting analysis เมื่อใช้ Anti-His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีนซึ่งมี His₆ Tag ซึ่งพบแถบสัญญาณของรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้ง 4 ชนิด ที่ขนาดเช่นเดียวกัน (รูปที่ 5.40B, เลน 2, 4, 6 และ 8)

ในขณะที่ผล Western blotting analysis เมื่อใช้ Anti-VP1 Polyclonal Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ พบแถบสัญญาณเกิดขึ้นที่ขนาด 45, 73 และ 85 กิโลดาลตัน (kDa) (รูปที่ 5.40C) ในเลน 4, 6 และ 8 ซึ่งการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$, $VP2/\Delta 60N_VP1$ และ $\Delta 60N_VP1/VP2$ จากผลการทดลองนี้จึงยืนยันได้ว่า รีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้ง 3 ชนิดนี้ ซึ่งเป็นโปรตีน VP1 หรือมีโปรตีน VP1 ประกอบอยู่ ในส่วนผล Western blotting analysis เมื่อใช้ Anti-VP2 Polyclonal Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ พบแถบสัญญาณเกิดขึ้นที่ขนาด 28, 73 และ 85 กิโลดาลตัน (kDa) (รูปที่ 5.40D) ในเลน 2, 6 และ 8 ซึ่งการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $VP2$, $VP2/\Delta 60N_VP1$ และ $\Delta 60N_VP1/VP2$ นอกจากนี้ยังปรากฏแถบสัญญาณที่ขนาดอื่นๆซึ่งอาจเกิดจากโปรตีนเกิดการถูกละลายหรือเกิดจากการจับแบบไม่จำเพาะของแอนติบอดีที่ใช้ทดสอบซึ่งเป็นพอลิโคลนัลแอนติบอดี อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองนี้สามารถยืนยันได้ว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้ง 3 ชนิดนี้ ซึ่งเป็นโปรตีน $VP2$ หรือมีโปรตีน $VP2$ ประกอบอยู่

จากผลการทดสอบความจำเพาะของรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้ง 4 ชนิดที่แสดงออกกับแอนติบอดีปฐมภูมิชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Western blotting analysis จึงสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 5.2 แสดงถึงรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$, $VP2/\Delta 60N_VP1$ และ $\Delta 60N_VP1/VP2$ เป็นโปรตีนหรือมีโปรตีน $VP1$ อยู่ ในขณะที่ $VP2$, $VP2/\Delta 60N_VP1$ และ $\Delta 60N_VP1/VP2$ เป็นโปรตีนหรือมีโปรตีน $VP2$ อยู่ จึงได้ทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้ง 4 ชนิดให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป

ตารางที่ 5.2 สรุปผลการทดสอบความจำเพาะของรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้ง 4 ชนิดที่แสดงออกกับแอนติบอดีปฐมภูมิชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Western blotting analysis

ที่	ชนิดของรีคอมบิแนนท์โปรตีน	ขนาดแถบสัญญาณ (kDa)	ผลการพบแถบสัญญาณกับแอนติบอดีปฐมภูมิ		
			Anti- His Tag Antibody	Anti-VP1 Polyclonal Antibody	Anti-VP2 Polyclonal Antibody
1	$\Delta 60N_VP1$	45	พบ	พบ	ไม่พบ
2	$VP2$	28	พบ	ไม่พบ	พบ
3	$VP2/\Delta 60N_VP1$	73	พบ	พบ	พบ
4	$\Delta 60N_VP1/VP2$	85	พบ	พบ	พบ

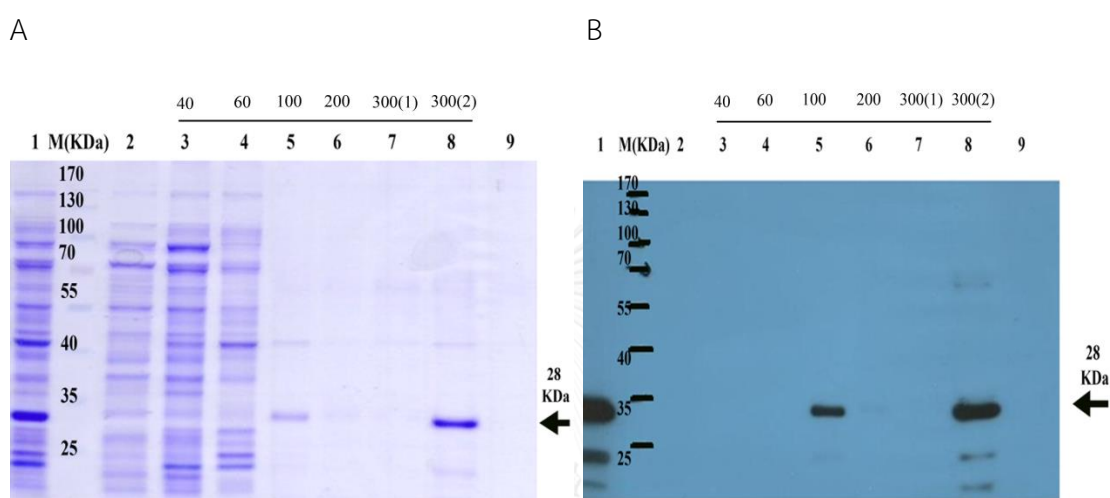
5.3. การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนของเชื้อไวรัส CAV ให้บริสุทธิ์

หลังจากทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการชักนำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีน ทั้ง 4 รูปแบบ มีการแสดงออกในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ Roseta-gami แล้ว จึงได้ทำการขยายขนาดในการแสดงออกของโปรตีนโดยใช้แบคทีเรียตั้งต้น จำนวน 3 เท่าของ 1.25 OD_{600} ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอลและกานามัยซิน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และทำการเลี้ยงเชื้อจนกระทั่ง OD_{600} ประมาณ $0.4 - 0.6 \text{ OD}_{600}$ แล้วจึงชักนำให้มีการแสดงออกของโปรตีนตามสภาวะที่เหมาะสมตามตารางที่ 5.1 หลังจากนั้นแบ่งเก็บเซลล์หลอดละ 25 OD_{600} มาทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ตามความสามารถในการละลายของรีคอมบิแนนท์โปรตีน ซึ่งได้ผลจากการทดลองดังนี้

5.3.1 การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีคุณสมบัติการละลาย (soluble form) ให้บริสุทธิ์

จากการทดสอบคุณสมบัติการละลายของโปรตีนซึ่งพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2สามารถละลายได้ใน ENZhance lysis buffer จึงทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนให้บริสุทธิ์โดยนำตะกอนเซลล์ จำนวน 25 OD_{600} ละลายด้วย ENZhance lysis buffer เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียแตกออก รีคอมบิแนนท์โปรตีนจึงละลายออกมาอยู่ใน ENZhance lysis buffer จากนั้นจึงเติม DNase I เพื่อย่อย genomic DNA ของแบคทีเรียและทำให้สารละลายโปรตีนมีความหนืดลดลงแล้วจึงแยกส่วนในของสารละลายโปรตีนออกจาก cell debris ด้วยการปั่นเหวี่ยงส่วนในของสารละลายโปรตีนจะถูกแยกให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Nickel column chromatography โดยนำสารละลายโปรตีนผสมกับ SP binding buffer ซึ่งช่วยให้โปรตีนมีคุณสมบัติยึดจับกับ Ni^{2+} ภายในคอลัมน์ แล้วจึงกรองเพื่อขจัดสิ่งสกปรกหรือซากเซลล์ที่ตกค้างที่ปะปนมาก่อนผ่านคอลัมน์ จากผลการทดลองหลังจากนำสารละลายโปรตีนผสมผ่านคอลัมน์และชะคอลัมน์ด้วย SP elution buffer ที่มี imidazole ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าความเข้มข้นของ imidazole ที่ 100 และ 300 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (รูปที่ 5.41A, เลข 5 และ 8) โดยพบรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 ซึ่งมีขนาด 28 KDa

สอดคล้องกับผลแถบสัญญาณของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 ซึ่งได้จากการตรวจติดตามโปรตีนด้วยวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti - His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน (รูปที่ 5.41B) และจากผลการทดลองดังกล่าวพบว่า รีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 ที่ถูกชะออกมาในเลน 5 และ 8 ซึ่งใช้ SP elution buffer ที่มี imidazole 100 และ 300 มิลลิโมลาร์ เช่นเดียวกัน และพบโปรตีนบางส่วนถูกย่อยมีขนาดน้อยกว่า 25 KDa ซึ่งสังเกตได้อย่างชัดเจนจากแถบสัญญาณที่ติดตามได้



รูปที่ 5.37 ผลการวิเคราะห์ SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 เมื่อทำให้บริสุทธิ์

เลน M	Protein Marker (Fermentas, USA)
เลน 1	Crude protein
เลน 2	Flow through
เลน 3-8	Elute ด้วย SP elution buffer
เลน 9	Strip out
40	Elute ด้วย SP elution buffer ที่มี imidazole 40 มิลลิโมลาร์
60	Elute ด้วย SP elution buffer ที่มี imidazole 60 มิลลิโมลาร์
100	Elute ด้วย SP elution buffer ที่มี imidazole 100 มิลลิโมลาร์
200	Elute ด้วย SP elution buffer ที่มี imidazole 200 มิลลิโมลาร์
300(1)	Elute ด้วย SP elution buffer ที่มี imidazole 100 มิลลิโมลาร์ (ส่วนที่ 1)
300(2)	Elute ด้วย SP elution buffer ที่มี imidazole 100 มิลลิโมลาร์ (ส่วนที่ 2)

จากผลการทดลองดังกล่าวจึงได้รีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 บริสุทธิ์ที่อยู่ใน SP elution buffer ที่มี imidazole ความเข้มข้น 100 และ 300 มิลลิโมลาร์

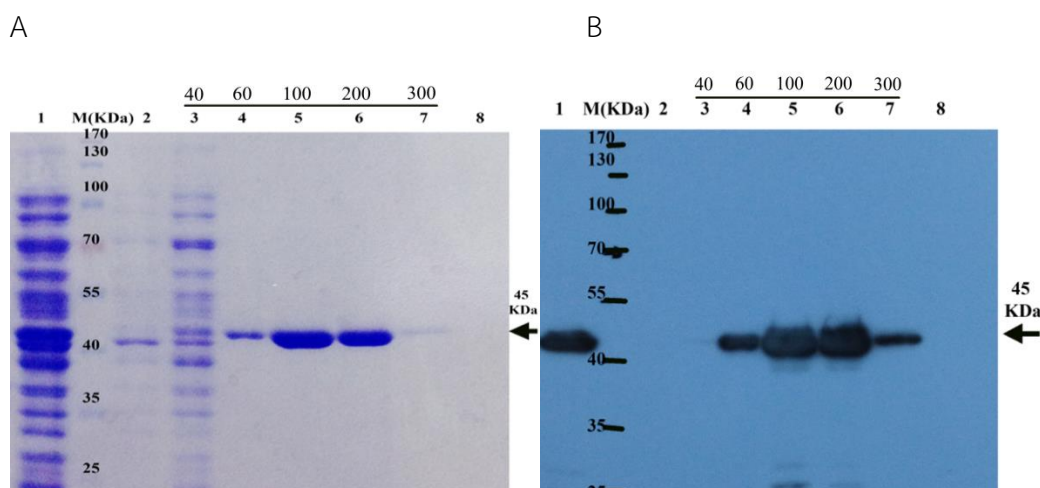
5.3.2 การทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่คุณสมบัติไม่ละลาย (Insoluble form) บริสุทธิ์

จากการทดสอบคุณสมบัติการละลายของโปรตีนซึ่งพบว่าโปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1, Δ 60N_VP1/VP2 และ Δ 60N_VP1 อยู่ในรูปไม่ละลาย จึงทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ตามวิธีการของ Schlager และคณะ, (2012) โดยนำตะกอนเซลล์ จำนวน 25 OD₆₀₀ ละลายด้วยบัฟเฟอร์ที่มี 1% SDS (PCL buffer) และอาศัยคลื่นเสียง (sonicate) ช่วยทำให้เซลล์แตกที่เรียกแตกออก โปรตีนภายในเซลล์จึงละลายออกมาอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ จากนั้นจึงกำจัด SDS ออกจากสารละลายโปรตีนด้วยการตกตะกอนที่สภาวะเย็นจากนั้นตะกอนสีขาวของ SDS ที่เกิดขึ้นรวมถึง cell debris สามารถแยกออกจากสารละลายโปรตีนได้ด้วยการปั่นเหวี่ยงส่วนใสของสารละลายโปรตีนที่ได้ถูกแยกให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Nickel column chromatography โดยนำสารละลายโปรตีนผสมกับบัฟเฟอร์ที่มี 0.1% sarkosyl (w/v) (PCW buffer) แล้วจึงกรองเพื่อขจัดสิ่งสกปรกหรือซากเซลล์ที่ตกค้างที่ปะปนมาก่อนผ่านคอลัมน์ จากผลการทดลองเมื่อนำสารละลายโปรตีนผสมผ่านคอลัมน์และชะคอลัมน์ด้วย PCE elution buffer ที่มี imidazole ความเข้มข้นต่างๆ พบรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้ง 3 ชนิด ถูกชะออกมาแตกต่างกัน ดังนี้

5.3.2.1 รีคอมบิแนนท์โปรตีน Δ 60N_VP1

จากการวิเคราะห์ SDS-PAGE พบว่า รีคอมบิแนนท์โปรตีน Δ 60N_VP1 ขนาด 45 KDa สามารถถูกชะออกจากคอลัมน์ โดยใช้ PCE buffer ที่มี imidazole ความเข้มข้น 60, 100, 200 และ 300 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (รูปที่ 5.42A, เลข 4, 5, 6 และ 7) และพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน Δ 60N_VP1 ถูกชะออกมาปริมาณมากในเลน 5 และ 6 ซึ่งใช้ PCE elution buffer ที่มี imidazole ความเข้มข้น 100 และ 200 มิลลิโมลาร์

สอดคล้องกับผลการตรวจติดตามโปรตีนด้วยวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti - His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน (รูปที่ 5.42B) โดยพบแถบสัญญาณในเลน 4-7 (60, 100, 200 และ 300 มิลลิโมลาร์ imidazole) และพบแถบสัญญาณมีความเข้มสูงในเลน 5 และ 6 (100 และ 200 มิลลิโมลาร์ imidazole) นอกจากนี้ยังพบแถบสัญญาณอื่นๆ ที่ขนาดต่ำที่ประมาณ 25 - 30 KDa ซึ่งสังเกตได้จากแถบสัญญาณที่ติดตามได้



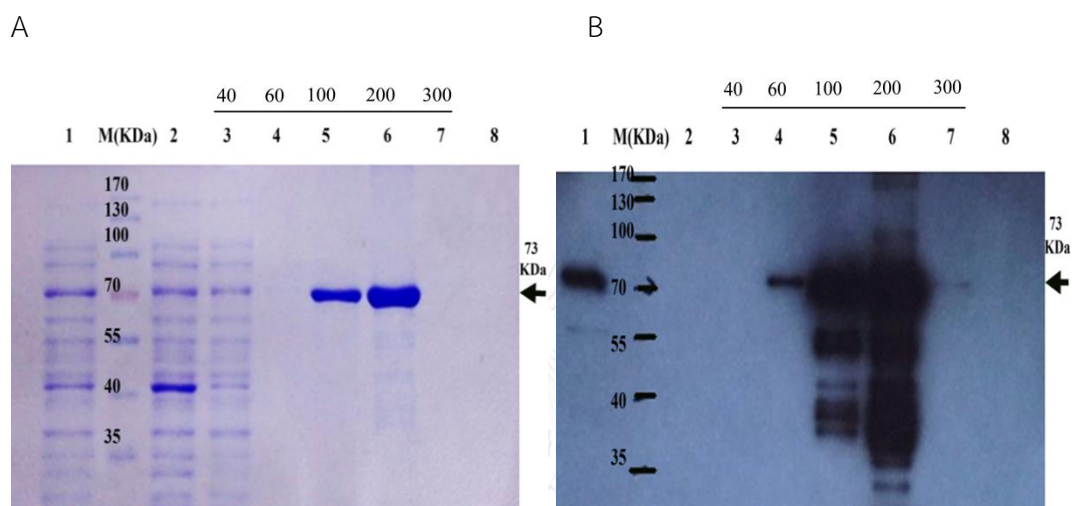
รูปที่ 5.38 ผลการวิเคราะห์ SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ เมื่อทำให้บริสุทธิ์

เลน M	Protein Marker (Fermentas, USA)
เลน 1	Crude protein
เลน 2	Flow through
เลน 3-7	Elute ด้วย PCE elution buffer
เลน 8	Strip out
40	Elute ด้วย PCE elution buffer ที่มี imidazole 40 มิลลิโมลาร์
60	Elute ด้วย PCE elution buffer ที่มี imidazole 60 มิลลิโมลาร์
100	Elute ด้วย PCE elution buffer ที่มี imidazole 100 มิลลิโมลาร์
200	Elute ด้วย PCE elution buffer ที่มี imidazole 200 มิลลิโมลาร์
300	Elute ด้วย PCE elution buffer ที่มี imidazole 100 มิลลิโมลาร์

จากผลการทดลองดังกล่าวจึงได้รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ที่บริสุทธิ์อยู่ใน PCE buffer ที่มี imidazole ความเข้มข้น 60, 100, 200 และ 300 มิลลิโมลาร์

5.3.2.2 รีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1

จากการวิเคราะห์ SDS-PAGE พบว่า รีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 สามารถถูกชะออกจากคอลัมน์ เมื่อใช้ PCE elution buffer ที่มี imidazole ความเข้มข้นที่ 100 และ 200 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (รูปที่ 5.43A, เลน 5 และ 6) โดยพบรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 ซึ่งมีขนาด 73 KDa



รูปที่ 5.39 ผลการวิเคราะห์ SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 เมื่อทำให้บริสุทธิ์

เลน M	Protein Marker (Fermentas, USA)
เลน 1	Crude protein
เลน 2	Flow through
เลน 3-7	Elute ด้วย PCE elution buffer
เลน 8	Strip out
40	Elute ด้วย PCE elution buffer ที่มี imidazole 40 มิลลิโมลาร์
60	Elute ด้วย PCE elution buffer ที่มี imidazole 60 มิลลิโมลาร์
100	Elute ด้วย PCE elution buffer ที่มี imidazole 100 มิลลิโมลาร์
200	Elute ด้วย PCE elution buffer ที่มี imidazole 200 มิลลิโมลาร์
300	Elute ด้วย PCE elution buffer ที่มี imidazole 100 มิลลิโมลาร์

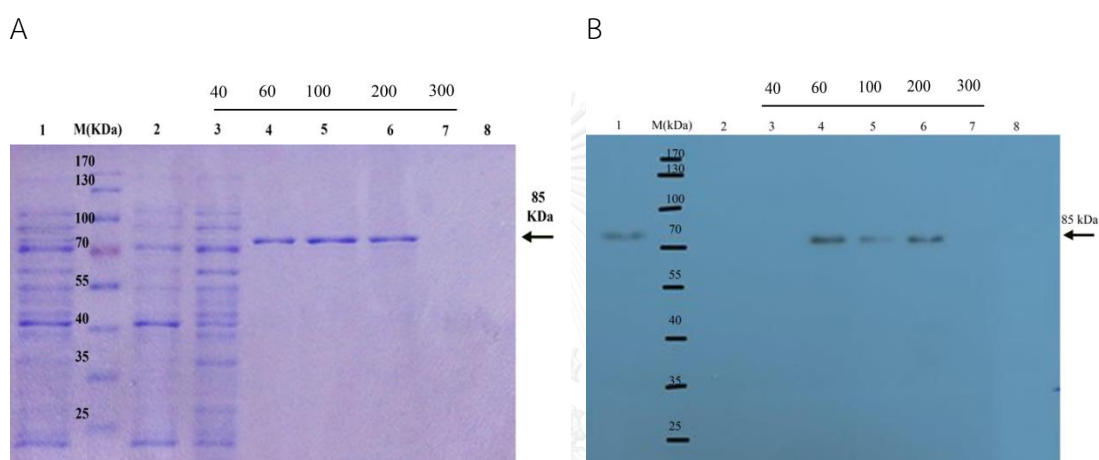
แต่ผลการตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 ด้วยวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti – His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน (รูปที่ 5.43B) พบแถบสัญญาณของโปรตีนที่ขนาดดังกล่าวเพิ่มเติมในเลน 4 และ 7 ซึ่งใช้ PCE elution buffer ที่มี imidazole ความเข้มข้นที่ 60 และ 300 มิลลิโมลาร์ แต่มีปริมาณรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 ที่ถูกชะออกมาน้อย เมื่อเทียบความเข้มของแถบสัญญาณในเลน 5 และ 6 (100 และ 200 มิลลิโมลาร์ imidazole) นอกจากนี้ยังพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1 ที่ถูกชะออกมาในเลน 5 และ 6 (100 และ 200 มิลลิโมลาร์ imidazole) ส่วนใหญ่ถูกย่อยซึ่งสามารถเห็นได้ชัดเจนจากแถบสัญญาณที่ติดตามได้

จากผลการทดลองดังกล่าวจึงได้รีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ Δ 60N_VP1บริสุทธิ์ที่อยู่ใน PCE elution buffer ที่มี imidazole ความเข้มข้น 60, 100, 200 และ 300 มิลลิโมลาร์



5.3.2.3 รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$

จากการวิเคราะห์ SDS-PAGE พบว่า รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ สามารถถูกชะออกจากคอลัมน์ เมื่อใช้ PCE elution buffer ที่มี imidazole ความเข้มข้น 60, 100 และ 200 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 5.44A, เลน 4, 5 และ 6) โดยพบรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ มีขนาด 85 KDa สอดคล้องกับผลการตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ ด้วยวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti – His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ สำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน (รูปที่ 5.44B) พบแถบสัญญาณของโปรตีนที่ขนาดดังกล่าวมีความเข้มในเลน 4, 5 และ 6 (60, 100 และ 200 มิลลิโมลาร์ imidazole) ไม่แตกต่างกัน



รูปที่ 5.40 ผลการวิเคราะห์ SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ เมื่อทำให้บริสุทธิ์

เลน M	Protein Marker (Fermentas, USA)
เลน 1	Crude protein
เลน 2	Flow through
เลน 3-7	Elute ด้วย PCE elution buffer
เลน 8	Strip out
40	Elute ด้วย PCE elution buffer ที่มี imidazole 40 มิลลิโมลาร์
60	Elute ด้วย PCE elution buffer ที่มี imidazole 60 มิลลิโมลาร์
100	Elute ด้วย PCE elution buffer ที่มี imidazole 100 มิลลิโมลาร์
200	Elute ด้วย PCE elution buffer ที่มี imidazole 200 มิลลิโมลาร์
300	Elute ด้วย PCE elution buffer ที่มี imidazole 100 มิลลิโมลาร์

จากผลการทดลองดังกล่าวจึงได้รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ บริสุทธิ์ ที่อยู่ใน PCE elution buffer ที่มี imidazole ความเข้มข้น 60, 100 และ 200 มิลลิโมลาร์

จากการศึกษาทั้งหมดนี้จึงสามารถสรุปผลการทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้ง 4 ชนิด ให้บริสุทธิ์ด้วยการชะรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์จากคอลัมน์ด้วย Elution buffer ที่มีความเข้มข้นของ imidazole ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 5.3 โดยความเข้มข้นของ imidazole ที่ 100 มิลลิโมลาร์ สามารถชะรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 ได้ ในขณะที่รีคอมบิแนนท์โปรตีนอีก 3 ชนิด ได้แก่ $\Delta 60N_VP1$, VP2/ $\Delta 60N_VP1$ และ $\Delta 60N_VP1/VP2$ สามารถถูกชะออกจากคอลัมน์ได้ด้วยความเข้มข้นของ imidazole ตั้งแต่ 60 มิลลิโมลาร์ ขึ้นไป

ตารางที่ 5.3 สรุปผลการทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้ง 4 ชนิดบริสุทธิ์

ที่	ชนิดของรีคอมบิแนนท์โปรตีน	คุณสมบัติการละลาย	ขนาดโปรตีน (kDa)	ผลการชะรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์จากคอลัมน์ด้วย Elution buffer ที่มีความเข้มข้นของ imidazole ต่างๆ (มิลลิโมลาร์)				
				40	60	100	200	300
1	VP2	ละลาย	28	-	-	+	-	+
2	$\Delta 60N_VP1$	ไม่ละลาย	45	-	+	+	+	+
3	VP2/ $\Delta 60N_VP1$	ไม่ละลาย	73	-	+	+	+	+
4	$\Delta 60N_VP1/VP2$	ไม่ละลาย	85	-	+	+	+	-

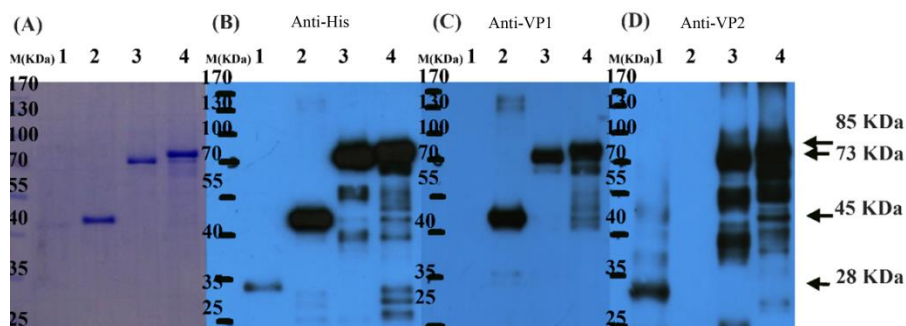
+ = พบรีคอมบิแนนท์โปรตีน

- = ไม่พบรีคอมบิแนนท์โปรตีน

5.3.3 ผลการยืนยันรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP1 และ VP2 ที่บริสุทธิ์

เมื่อได้รีคอมบิแนนท์ทั้ง 4 ชนิด ที่บริสุทธิ์แล้วจึงนำโปรตีนมาทดสอบยืนยันว่าเป็นโปรตีน VP1 และ VP2 ด้วยวิธี Western blotting analysis โดยใช้ Anti-VP1 Polyclonal Antibody และ Anti-VP2 Polyclonal Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ และใช้ Anti-His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน ทั้ง 4 ชนิด ซึ่งมี His₆ Tag

จากผล SDS-PAGE พบแถบโปรตีนของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$, VP2/ $\Delta 60N_VP1$ และ $\Delta 60N_VP1/VP2$ ปรากฏที่ขนาด 45, 73 และ 85 กิโลดาลตัน (kDa) (รูปที่ 5.45A, เลน 2-4) ในขณะที่ไม่พบแถบโปรตีนของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 ที่ขนาด 28 กิโลดาลตัน (kDa) (รูปที่ 5.45A, เลน 1) เนื่องจากใช้ปริมาณโปรตีนน้อยเกินไปจึงไม่สามารถมองเห็นจากเจล SDS อย่างไรก็ตามผล Western blotting analysis เมื่อใช้ Anti-His Tag Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีนซึ่งมี His₆ Tag สามารถพบแถบสัญญาณของรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ทั้ง 4 ชนิด ที่ขนาด 28, 45, 73 และ 85 กิโลดาลตัน (kDa) (รูปที่ 5.45B, เลน 1-4) และพบการย่อยของรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ $\Delta 60N_VP1$ และ $\Delta 60N_VP1/VP2$ เกิดขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อสังเกตจากแถบสัญญาณโดยการย่อยเกิดของโปรตีนเกิดขึ้นกับโปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ มากกว่าโปรตีน VP2/ $\Delta 60N_VP1$



รูปที่ 5.41 ผลการวิเคราะห์ SDS-PAGE (A) และ Western blotting analysis (B) โดยใช้ Anti-His Tag Antibody (1:4,000) (B) Anti-VP1 Polyclonal Antibody (1:5,000) (C) Anti-VP2 Polyclonal Antibody (1:5,000) (D) ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ทั้ง 4 ชนิด

- | | |
|-------|--|
| เลน M | Protein Marker (Fermentas, USA) |
| เลน 1 | รีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 ที่บริสุทธิ์ |
| เลน 2 | รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ที่บริสุทธิ์ |
| เลน 3 | รีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/ $\Delta 60N_VP1$ ที่บริสุทธิ์ |
| เลน 4 | รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ ที่บริสุทธิ์ |

ในขณะที่ผล Western blotting analysis เมื่อใช้ Anti-VP1 Polyclonal Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ พบแถบสัญญาณเกิดขึ้นที่ขนาด 45, 73 และ 85 กิโลดาลตัน (kDa) (รูปที่ 5.45C) เฉพาะในเลน 2-4 ซึ่งเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$, $VP2/\Delta 60N_VP1$ และ $\Delta 60N_VP1/VP2$ ที่บริสุทธิ์ นอกจากนี้ยังปรากฏแถบสัญญาณที่ขนาดอื่นๆ ในเลน 4 ซึ่งเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ ซึ่งอาจเกิดจากโปรตีนเกิดการถูกย่อยหรือเกิดจากการจับแบบไม่จำเพาะของแอนติบอดีที่ใช้ทดสอบซึ่งเป็นพอลิโคลนัลแอนติบอดี อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองนี้ จึงยืนยันได้ว่า รีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิดนี้ เป็นโปรตีน VP1 หรือมีโปรตีน VP1 ประกอบอยู่

ส่วนผล Western blotting analysis เมื่อใช้ Anti-VP2 Polyclonal Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ พบแถบสัญญาณเกิดขึ้นที่ขนาด 28, 73 และ 85 กิโลดาลตัน (kDa) (รูปที่ 5.45D) เฉพาะในเลน 1, 3 และ 4 ซึ่งเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีน $VP2$, $VP2/\Delta 60N_VP1$ และ $\Delta 60N_VP1/VP2$ ที่บริสุทธิ์ นอกจากนี้ยังปรากฏแถบสัญญาณที่ขนาดอื่นๆทั้งในเลน 3 และ 4 เป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีน $VP2/\Delta 60N_VP1$ และ $\Delta 60N_VP1/VP2$ ซึ่งอาจเกิดจากโปรตีนเกิดการถูกย่อยหรือเกิดจากการจับแบบไม่จำเพาะของแอนติบอดีที่ใช้ทดสอบซึ่งเป็นพอลิโคลนัลแอนติบอดี อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองนี้สามารถยืนยันได้ว่า รีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ทั้ง 3 ชนิดนี้ เป็นโปรตีน VP2 หรือมีโปรตีน VP2 ประกอบอยู่

จากรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ทั้ง 4 ชนิด ที่ได้จากการทดลอง จึงได้เลือกรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ เนื่องจากเป็นโปรตีนโครงสร้างหลักหรือแคปซิดโปรตีนซึ่งสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ในปริมาณสูง โดยเมื่อหาปริมาณรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ บริสุทธิ์จากส่วนของ PCE elution buffer ที่พบสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ บริสุทธิ์ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ พบว่าได้ปริมาณรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ บริสุทธิ์ เท่ากับ 3.751 มิลลิกรัม หรือ 150 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มิลลิลิตร (150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ดังแสดงในตารางที่ 5.4

ตารางที่ 5.4 ปริมาณทั้งหมดของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ บริสุทธิ์ ใน PCE elution buffer ที่มี imidazole ความเข้มข้นต่างๆ

Purification step	Total volume (ml)	Amount of protein ^a (mg/ml)	Total protein (mg)
PCW with 60 mM imidazole	20	0.0375	0.750
PCW with 100 mM imidazole	10	0.1	1
PCW with 200 mM imidazole	10	0.2	2
PCW with 300 mM imidazole	10	0.0001	0.001
Total protein from 25 ml of cell culture (25 OD₆₀₀ of bacteria cells)			3.751 (\approx 150 mg/l)

^a หมายถึง ความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้จากการเทียบความเข้มจากแถบโปรตีนของ BSA ที่ทราบความเข้มข้นบนเจล SDS-PAGE

จากการทดลองนี้จึงได้เลือกส่วนของ PCE elution buffer ที่พบสารละลายรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ บริสุทธิ์ในปริมาณสูงที่มี imidazole ความเข้มข้น 60, 100 และ 200 มิลลิโมลาร์ ไปกำจัดสาร sarkosyl และ imidazole ออกโดยวิธี dialysis และนำไปวัดความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ บริสุทธิ์ด้วยวิธี Bradford assay และทดสอบคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนตามลำดับ ก่อนนำไปใช้เป็นโปรตีนแอนติเจนสำหรับไปประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาวิธีตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CAV และการผลิตพอลิโคลนัลแอนติบอดี

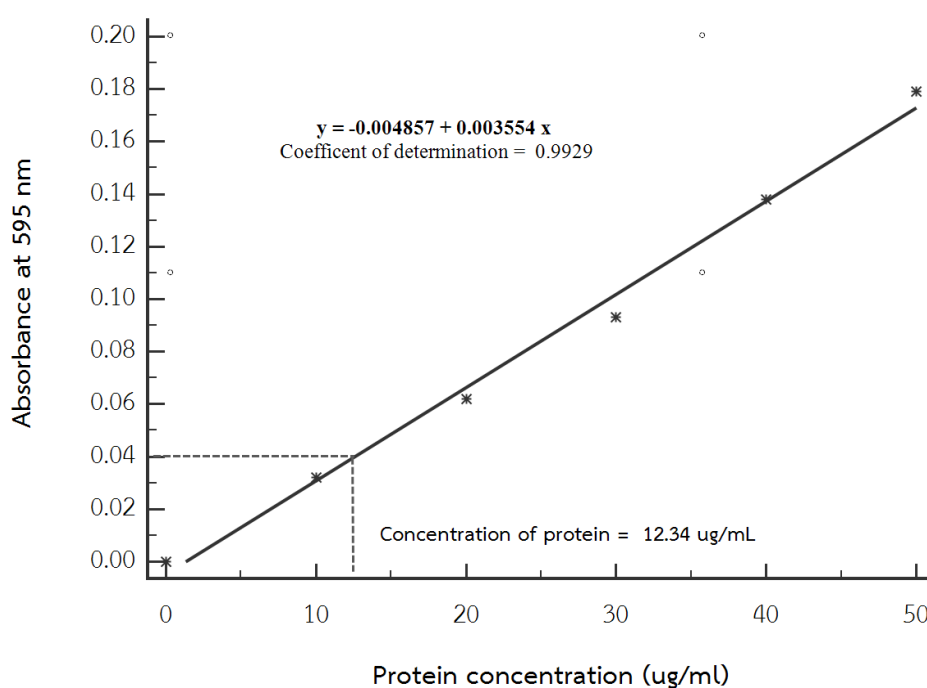
5.4 การหาความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีนบริสุทธิ์ด้วยวิธี Bradford assay

ภายหลังได้ผ่านกระบวนการ dialysis เพื่อกำจัดสาร imidazole และ sarkosyl ออกด้วยวิธี dialysis และเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์ให้เหมาะสมกับการนำไปประยุกต์ใช้ โดยเมื่อนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ บริสุทธิ์ที่ละลายใน dialysis buffer ซึ่งเป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ สำหรับใช้เป็นแอนติเจนเพื่อพัฒนาวิธีตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CAV จากนั้นมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นด้วยวิธี Bradford assay พบผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (OD_{595}) ของสารมาตรฐาน (Standard) เป็นโปรตีน Bovine serum albumin (BSA) ที่มีความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร, ตัวอย่างโปรตีนแอนติเจน $\Delta 60VP1$ และ dialysis buffer เป็น Blank สามารถแสดงดังตารางที่ 5.5

ตารางที่ 5.5 แสดงผลการวัดความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ สำหรับใช้เป็นโปรตีนแอนติเจนในวิธี indirect ELISA ด้วยวิธี Bradford assay

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร			
		วัดครั้งที่ 1	วัดครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย	$OD_{595}Sample - OD_{595}Blank$ (ΔOD_{595})
Blank	0	0.365	0.355	0.360	0
Standard 1	10	0.393	0.391	0.392	0.032
Standard 2	20	0.418	0.425	0.422	0.062
Standard 3	30	0.453	0.453	0.453	0.093
Standard 4	40	0.503	0.492	0.498	0.138
Standard 5	50	0.539	0.554	0.539	0.179
รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$	12.34	0.408	0.410	0.409	0.039

จากการนำค่าเฉลี่ยของ ΔOD_{595} มาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของโปรตีน (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (แกน Y) (รูปที่ 5.46) ได้สมการเส้นตรงดังนี้ $Y = -0.004857 + 0.003554X$ และมีค่า Coefficient of determination เท่ากับ 0.9929 จึงได้นำค่า ΔOD_{595} ของตัวอย่างโปรตีนแอนติเจน $\Delta 60VP1$ คือ 0.065 แทนค่า Y ในสมการดังกล่าว ดังนั้นความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ บริสุทธิ์สำหรับใช้เป็นแอนติเจนสำหรับพัฒนาวิธีตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CAV ที่ใช้ในการทดลองนี้จึงเท่ากับ 12.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



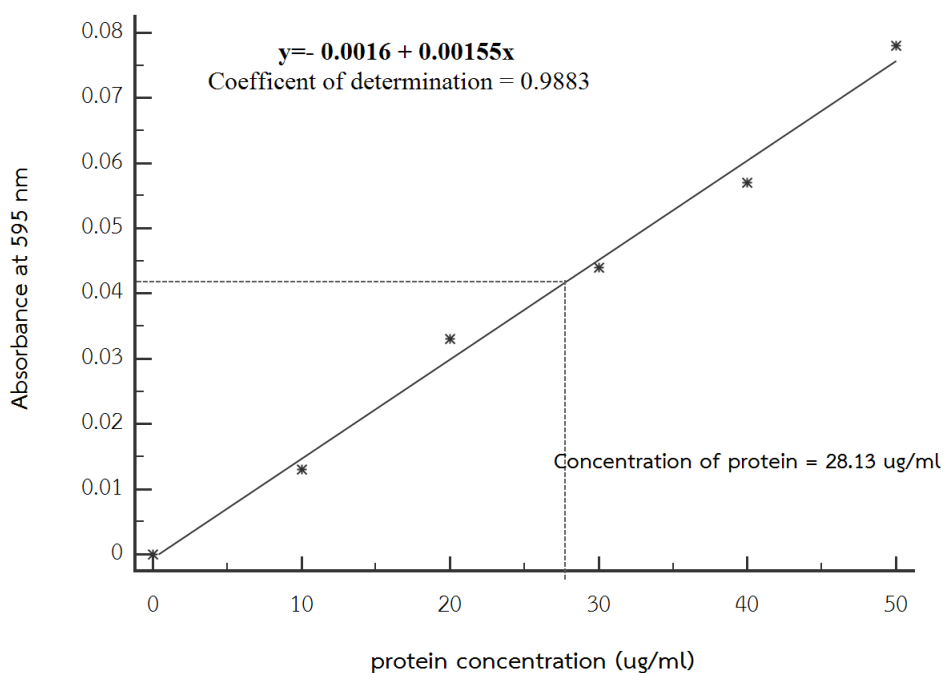
รูปที่ 5.42 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของโปรตีน (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (แกน Y) โดยใช้โปรตีนมาตรฐานเป็น BSA ที่มีความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ สำหรับพัฒนาวิธีตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CAV

ในขณะที่เมื่อนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ บริสุทธิ์ที่ละลายใน dialysis buffer ซึ่งเป็นสารละลาย PBS สำหรับใช้เป็นแอนติเจนเพื่อผลิตพอลิโคลนัลแอนติบอดี จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นด้วยวิธี Bradford assay พบผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (OD_{595}) ของสารมาตรฐาน (Standard) เป็นโปรตีน Bovine serum albumin (BSA) ที่มีความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, ตัวอย่างโปรตีนแอนติเจน $\Delta 60VP1$ และ dialysis buffer เป็น Blank สามารถแสดงดังตารางที่ 5.6

ตารางที่ 5.6 แสดงผลการวัดความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ สำหรับใช้เป็นโปรตีนแอนติเจนในการผลิตแอนติบอดีด้วยวิธี Bradford assay

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร			
		วัดครั้งที่ 1	วัดครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย	$OD_{595}Sample - OD_{595}Blank$ (ΔOD_{595})
Blank	0	0.217	0.231	0.224	0
Standard 1	10	0.227	0.247	0.237	0.013
Standard 2	20	0.254	0.259	0.257	0.033
Standard 3	30	0.260	0.275	0.268	0.044
Standard 4	40	0.273	0.289	0.281	0.057
Standard 5	50	0.299	0.305	0.302	0.078
รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$	28.13	0.262	0.270	0.266	0.042

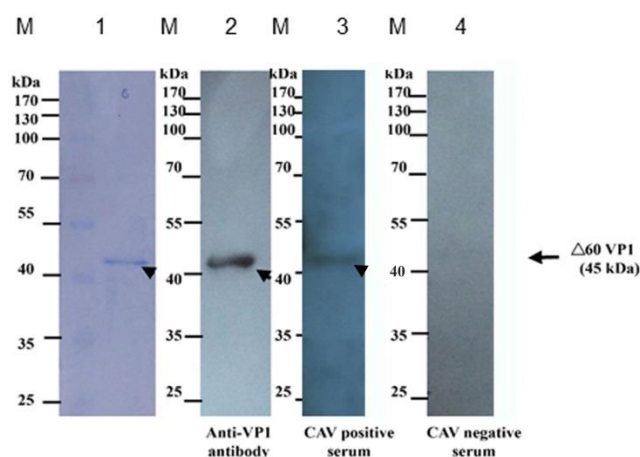
จากการนำค่าเฉลี่ยของ ΔOD_{595} มาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของโปรตีน (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (แกน Y) (รูปที่ 5.47) ได้สมการเส้นตรงดังนี้ $Y = -0.0016 + 0.00155X$ และมีค่า Coefficient of determination เท่ากับ 0.9883 จึงได้นำค่า ΔOD_{595} ของตัวอย่างโปรตีนแอนติเจน $\Delta 60VP1$ คือ 0.042 แทนค่า Y ในสมการดังกล่าว ดังนั้นรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ สำหรับผลิตพอลิโคลนัลแอนติบอดีจึงมีความเข้มข้นจริงเท่ากับ 28.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 5.43 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของโปรตีน (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (แกน Y) โดยใช้โปรตีนมาตรฐานเป็น BSA ที่มีความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ สำหรับผลิตพอลิโคลนัลแอนติบอดี

5.5 การคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$

การทดสอบคุณสมบัติความเป็นแอนติเจน (antigenicity) ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเป็นการทดสอบความจำเพาะระหว่างรีคอมบิแนนท์โปรตีนกับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CAV โดยนำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่บริสุทธิ์ละลายอยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์สำหรับใช้เป็นโปรตีนแอนติเจนในวิธี indirect ELISA ที่ทราบความเข้มข้นแล้วจากข้อ 5.4 มาทดสอบด้วยวิธี Western blotting analysis พบผลการวิเคราะห์ SDS-PAGE ปรากฏรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ มีขนาด 45 kDa สอดคล้องกับผลของ Western blotting analysis โดยใช้ Anti-VP1 antibody และซีรัมไก่ที่ให้ผลบวกจากการทดสอบด้วยชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูปยี่ห้อ IDEXX ซึ่งปรากฏแถบสัญญาณแถบเดียวที่มีขนาดเช่นเดียวกัน ในขณะที่ไม่ปรากฏแถบสัญญาณใดๆ เมื่อใช้ซีรัมไก่ที่ให้ผลลบจากการทดสอบด้วยชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูปยี่ห้อ IDEXX (รูปที่ 5.48)



รูปที่ 5.48 ผลการทดสอบคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$

- | | |
|-------|--|
| เลน M | Protein Marker (Fermentas, USA) |
| เลน 1 | ผลการวิเคราะห์ SDS-PAGE |
| เลน 2 | ผล Western blotting analysis โดยใช้ Anti – VP1 Antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ |
| เลน 3 | ผล Western blotting analysis โดยใช้ซีรัมไก่ที่ให้ผลบวก (CAV positive serum) เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ |
| เลน 4 | ผล Western blotting analysis โดยใช้ซีรัมไก่ที่ให้ผลลบ (CAV negative serum) เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ |

จากผลการทดสอบดังกล่าวแสดงถึงรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ มีคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนที่ดีและเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CAV และการผลิตพอลิโคลนัลแอนติบอดีในขั้นต่อไป

5.6 การประยุกต์ใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CAV ด้วยวิธี indirect enzyme linked immunosorbant assay (indirect ELISA)

5.6.1 การหาความเหมาะสมของวิธีด้วย checkerboard titration assay (CBT)

เมื่อได้รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ที่บริสุทธิ์จากข้อ 5.4 ที่ทราบความเข้มข้น และมีคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนสำหรับใช้เป็นโปรตีนแอนติเจนในการทดลองนี้ จึงทำการหาความเหมาะสมของวิธี โดยพิจารณาจากปัจจัยดังต่อไปนี้ ได้แก่ ปริมาณโปรตีนแอนติเจน, ระดับการเจือจาง ตัวอย่างซีรัมและสารคอนจูเกตหรือแอนติบอดีทุติยภูมิด้วยวิธี CBT โดยใช้ตัวอย่างซีรัมบวกซึ่งเป็นซีรัมที่ให้ผลบวกจากการทดสอบด้วยชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูปยี่ห้อ IDEXX จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ P1, P2 และ P3 และตัวอย่างซีรัมลบ (N) ซึ่งเป็นซีรัมที่ให้ผลลบจากการทดสอบด้วยชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูปยี่ห้อ IDEXX จำนวน 1 ตัวอย่าง โดยได้ทำการเจือจางโปรตีนแอนติเจน $\Delta 60VP1$ ด้วยสารละลาย coating buffer จำนวน 6 ระดับได้แก่ 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 และ 20 นาโนกรัม ต่อหลุม สำหรับเคลือบบนกันหลุมของไมโครเพลท และทดสอบกับตัวอย่างซีรัมที่เจือจางในระดับที่แตกต่างกันด้วยสารละลาย blocking buffer จำนวน 5 ระดับได้แก่ 1:10, 1:50, 1:100, 1:200 และ 1:400 โดยใช้ระดับการเจือจางของสารคอนจูเกตเท่ากับ 1: 2,000 ดังแสดงในตารางที่ 5.7

ตารางที่ 5.7 แสดงผลการหาปริมาณแอนติเจนและระดับการเจือจางของซีรัมที่เหมาะสมที่ระดับต่างๆ

ระดับ เจือจาง ซีรัม	ตัวอย่าง ซีรัม	ปริมาณโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ (นาโนกรัมต่อหลอด)											
		20		10		5		2.5		1.25		0.625	
		S/N	N (OD ₄₅₀)	S/N	N (OD ₄₅₀)	S/N	N (OD ₄₅₀)	S/N	N (OD ₄₅₀)	S/N	N (OD ₄₅₀)	S/N	N (OD ₄₅₀)
1/10	P1	2.090	2.754	3.667	3.630	2.045	2.386	3.018	0.339				
	P2	1.959	2.523	3.512	3.419	0.351	3.088	2.715	1.640	2.901	0.111	2.871	0.140
	P3	1.799	1.874	2.457	2.746	2.970	2.144	1.700	1.723	2.783	0.083	1.687	
1/50	P1	3.469	3.639	<u>3.781</u>	2.598	1.710	1.756						
	P2	3.184	3.402	<u>3.614</u>	2.898	0.127	2.828	0.099	1.723	2.783	0.083	1.687	
	P3	2.658	2.038	<u>2.116</u>	1.961	1.566	1.687		1.723	2.783	0.083	1.687	
1/100	P1	3.034	3.385	3.243	2.598	1.710	1.756						
	P2	2.700	3.134	3.030	2.898	0.127	2.828	0.099	1.723	2.783	0.083	1.687	
	P3	1.974	1.736	1.772	1.961	1.566	1.687		1.723	2.783	0.083	1.687	
1/200	P1	3.695	3.052	2.733	1.710	1.710	1.756						
	P2	3.311	2.904	2.920	1.609	0.138	2.144	0.090	1.371	2.257	0.070	1.756	
	P3	2.226	1.576	1.667	1.000	1.214	1.356		1.371	2.257	0.070	1.756	
1/400	P1	3.275	2.806	1.855	1.114	1.114	1.494						
	P2	3.555	2.994	2.243	1.074	0.149	1.759	0.079	1.143	1.778	0.063	1.494	
	P3	1.611	1.612	1.105	0.772	1.048	1.165		1.143	1.778	0.063	1.494	

P1: ตัวอย่างซีรัมบวก ที่ 1, P2: ตัวอย่างซีรัมบวก ที่ 2, P3: ตัวอย่างซีรัมบวก ที่ 3, N: ตัวอย่างซีรัมลบ (Background)

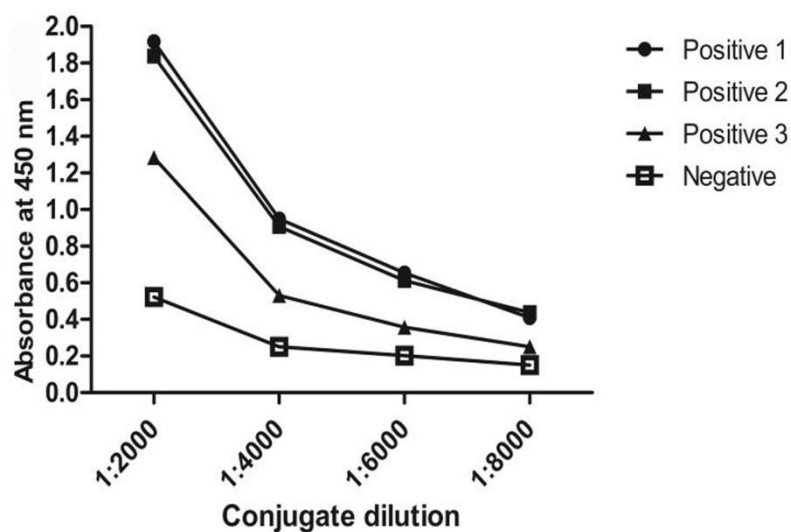
จากผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้ปริมาณแอนติเจน $\Delta 60N_VP1$ 5 นาโนกรัมต่อหลุม ที่ระดับการเจือจางตัวอย่างซีรัม 1:50 จะให้ค่าอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างซีรัม บวกต่อค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างซีรัมลบ หรือ S/N สูงสุด โดยให้ค่า S/N เมื่อตัวอย่างซีรัมบวก เป็น P1, P2 และ P3 ดังนี้คือ 3.781, 3.614 และ 2.116 โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงของผลลบ (Background) เท่ากับ 0.251 ดังนั้นจึงเลือกปริมาณแอนติเจน 5 นาโนกรัมต่อหลุมและระดับการ เจือจางตัวอย่างซีรัม 1:50 เป็นปริมาณแอนติเจนและระดับการเจือจางตัวอย่างซีรัมที่เหมาะสม สำหรับหาระดับการเจือจางของสารคอนจูเกตที่เหมาะสมในขั้นต่อไป

จากนั้นจึงหาระดับการเจือจางของสารคอนจูเกตที่เหมาะสมของวิธี indirect ELISA ต่อไป โดยใช้ปริมาณแอนติเจน $\Delta 60N_VP1$ ที่ 5 นาโนกรัม เคลือบลงบนหลุมของไมโครเพลทและ ทดสอบกับตัวอย่างซีรัมบวกและซีรัมลบชุดเดียวกันกับการทดลองก่อนหน้านี้ซึ่งนำมาเจือจาง 1:50 โดยสารคอนจูเกตที่ใช้ในการทดสอบได้ถูกเจือจางด้วยสารละลาย blocking buffer จำนวน 4 ระดับ ได้แก่ 1:2,000, 1:4,000, 1:6,000 และ 1:8,000 พบว่าระดับการเจือจางของสารคอนจูเกตที่ 1:6,000 เป็นระดับการเจือจางมากที่สุดที่ให้อัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างซีรัมบวก ต่อค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างซีรัมลบ หรือ S/N สูงสุด เมื่อตัวอย่างซีรัมบวกเป็น P1, P2 และ P3 ดังนี้คือ 5.219, 5.899 และ 2.215 ดังแสดงในตารางที่ 5.8

ตารางที่ 5.8 แสดงผลการหาระดับการเจือจางของสารคอนจูเกตที่เหมาะสมที่ระดับต่างๆ

ตัวอย่าง ซีรัม	ระดับการเจือจางของสารคอนจูเกต							
	1:2000		1:4000		1:6000		1:8000	
	S/N	N (OD ₄₅₀)	S/N	N (OD ₄₅₀)	S/N	N (OD ₄₅₀)	S/N	N (OD ₄₅₀)
P1	3.510		4.541		<u>5.219</u>		3.943	
P2	3.952	0.567	5.003	0.333	<u>5.899</u>	<u>0.228</u>	5.663	0.175
P3	1.878		2.126		<u>2.215</u>		2.234	

และเมื่อพิจารณาจากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ที่ระดับการเจือจางของสารคอนจูเกตต่างๆ ทั้ง 4 ตัวอย่าง (P1, P2, P3 และ N) ดังแสดงในรูปที่ 5.49 พบว่า ที่ระดับการเจือจางที่ 1: 6,000 เป็นระดับการเจือจางมากที่สุดที่ แยกแตกต่างระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของซีรัมบวกและลบได้ และให้ค่าการดูดกลืนแสงของผลลบ (Background) เท่ากับ 0.228 ดังนั้นจึงเลือกระดับการเจือจางของสารคอนจูเกตที่ 1:6,000 เป็น ระดับการเจือจางที่เหมาะสม

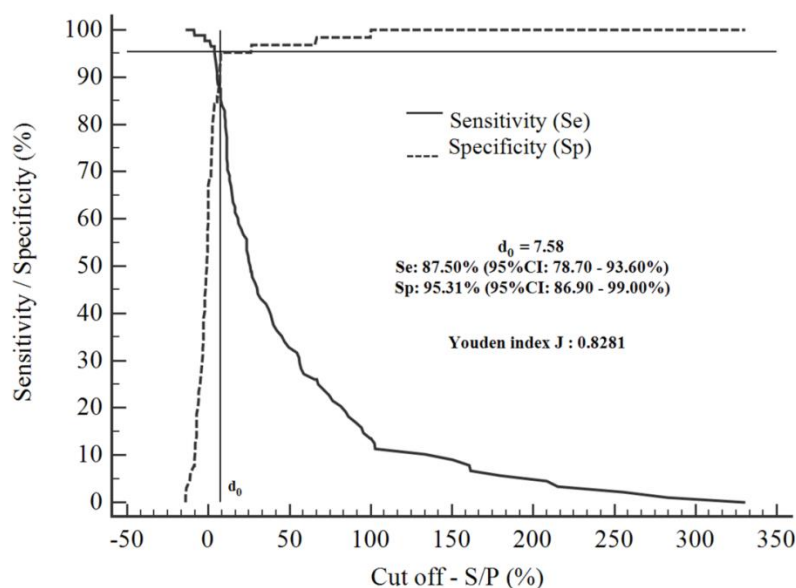


รูปที่ 5.49 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ที่ระดับการเจือจางของสารคอนจูเกตต่างๆ ของวิธี indirect ELISA

จากผลการทดลองนี้จึงได้ความเหมาะสมของวิธี indirect – ELISA ที่พัฒนาขึ้นโดยใช้ปริมาณโปรตีนแอนติเจน $\Delta 60N_VP1$ ที่ 15 นาโนกรัมต่อหลุม เป็นปริมาณแอนติเจนที่เหมาะสม ส่วนการเจือจางของตัวอย่างซีรัมและสารคอนจูเกตใช้ระดับการเจือจางที่ 1:50 และ 1:6,000 เป็นระดับการเจือจางที่เหมาะสม

5.6.2 การหาค่า Cut off ของวิธี indirect ELISA

เมื่อได้ความเหมาะสมของวิธี indirect ELISA แล้วจึงทำการทดสอบตัวอย่างซีรัมไก่ซึ่งทดสอบผลด้วยชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูป ยี่ห้อ IDEXX แล้ว จำนวน 152 ตัวอย่าง ผลการทดสอบด้วยวิธี indirect – ELISA ที่พัฒนาขึ้นอยู่ในรูปแบบค่าร้อยละอัตราส่วน sample ต่อ positive (%S/P) และผลการทดสอบด้วยชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูปยี่ห้อ IDEXX ซึ่งให้ผลอยู่ในรูปแบบผลบวกหรือผลลบ ได้ถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติ two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC) analysis โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป MedCalc® version 15.2.2 software ได้กราฟ TG-ROC แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า %S/P ของ 152 ตัวอย่าง (แกน X) และค่าความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ของวิธี indirect – ELISA เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทดสอบด้วยชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูปยี่ห้อ IDEXX (แกน Y) ดังแสดงในรูปที่ 5.50



รูปที่ 5.44 กราฟ two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC) analysis สำหรับหาค่า Cut off ของวิธี indirect ELISA

จากกราฟพบว่า จุดตัดตรงกับตำแหน่ง d_0 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.58 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ให้ค่า Youden index J สูงสุด มีค่าเท่ากับ 0.8281 ตำแหน่งดังกล่าวจึงเป็นตำแหน่งที่เหมาะสมสำหรับเป็นค่า Cut off ตามวิธีการพิจารณาค่า Cut off ของ Greiner (2000) [62] ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้ค่า %S/P ที่ 7.58 เป็นค่า Cut off ที่เหมาะสมของวิธี indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้นนี้และสามารถแปลผลบวกหรือผลลบของวิธี indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้นนี้โดยพิจารณาค่า %S/P ของตัวอย่างทดสอบที่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 7.58 ให้ผลลบและพิจารณาค่า %S/P ที่มากกว่า 7.58 ให้ผลบวก

5.6.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี indirect ELISA กับวิธีของชุดทดสอบ

ELISA สำเร็จรูปยี่ห้อ IDEXX

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้นกับชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูปยี่ห้อ IDEXX ซึ่งใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับในการทดลองนี้ ดังแสดงในตารางที่ พบว่า จากตัวอย่างซีรัมไก่ทั้งหมด 152 ตัวอย่าง มีจำนวน 14 ตัวอย่างที่ให้ผลต่างกันระหว่างสองวิธีโดยมีจำนวน 11 ตัวอย่าง แสดงผลเป็นลบเมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA แต่ให้ผลบวกเมื่อทดสอบด้วยชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูปยี่ห้อ IDEXX แสดงถึงผลลบปลอม (false negative) และเมื่อคำนวณหาค่าความไว (sensitivity) ของวิธีทดสอบพบว่ามีค่าเท่ากับ 87.50% (77/88) ในขณะที่พบผลบวกปลอม (false positive) ซึ่งแสดงผลเป็นบวกเมื่อทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA แต่กลับให้ผลลบเมื่อทดสอบด้วยชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูปยี่ห้อ IDEXX จำนวน 3 ตัวอย่าง และเมื่อคำนวณหาค่าความจำเพาะ (specificity) ของวิธีทดสอบพบมีค่าเท่ากับ 95.31% (61/64)



ตารางที่ 5.9 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้นกับชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูปยี่ห้อ IDEXX

วิธีทดสอบ	In-house indirect ELISA (cut off value (%S/P) = 7.58)		Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)	Kappa (k) value (95% CI)
	+	-				
		รวม				0.814 (0.722 – 0.906)
IDEXX	+	77	11	88	87.50%	95.31%
ELISA kit	-	3	61	64	90.79%	
	รวม	80	72	152		

และเมื่อพิจารณาความสอดคล้องของผลการทดสอบทั้งสองวิธีพบว่ามีจำนวน 138 ตัวอย่างให้ผลการทดสอบตรงกัน ซึ่งเมื่อนำไปคำนวณหาค่าแม่นยำของวิธี (accuracy) ของวิธีทดสอบ พบจึงได้ค่าเท่ากับ 90.79% (138/152) นอกจากนี้เมื่อนำไปวิเคราะห์หาระดับความสอดคล้องของทั้งสองวิธีด้วยวิธีวิเคราะห์ทางสถิติโดยแสดงค่า *Kappa (k)* ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% พบมีค่าเท่ากับ 0.814 ซึ่งแสดงถึงผลการทดสอบของวิธี indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้นมีความสอดคล้องกับวิธีทดสอบโดยชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูปยี่ห้อ IDEXX ในระดับสูง

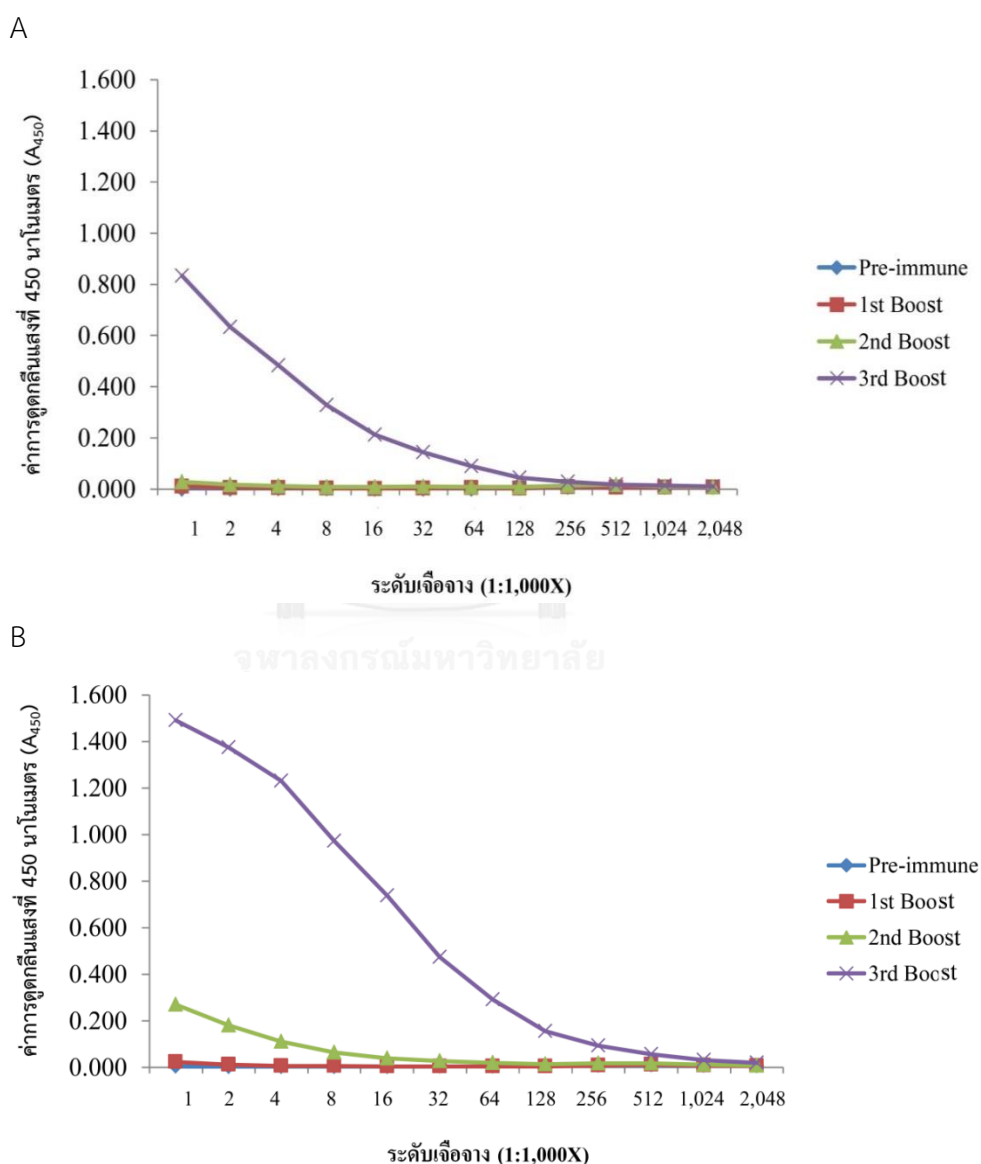
จากการศึกษานี้จึงแสดงให้เห็นว่า วิธี indirect ELISA สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CAV โดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60VP1$ ได้ถูกพัฒนาขึ้นสำเร็จและพบว่ามีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูปตามท้องตลาด



5.7 การประยุกต์ใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60VP1$ สำหรับผลิตพอลิโคลนัลแอนติบอดี

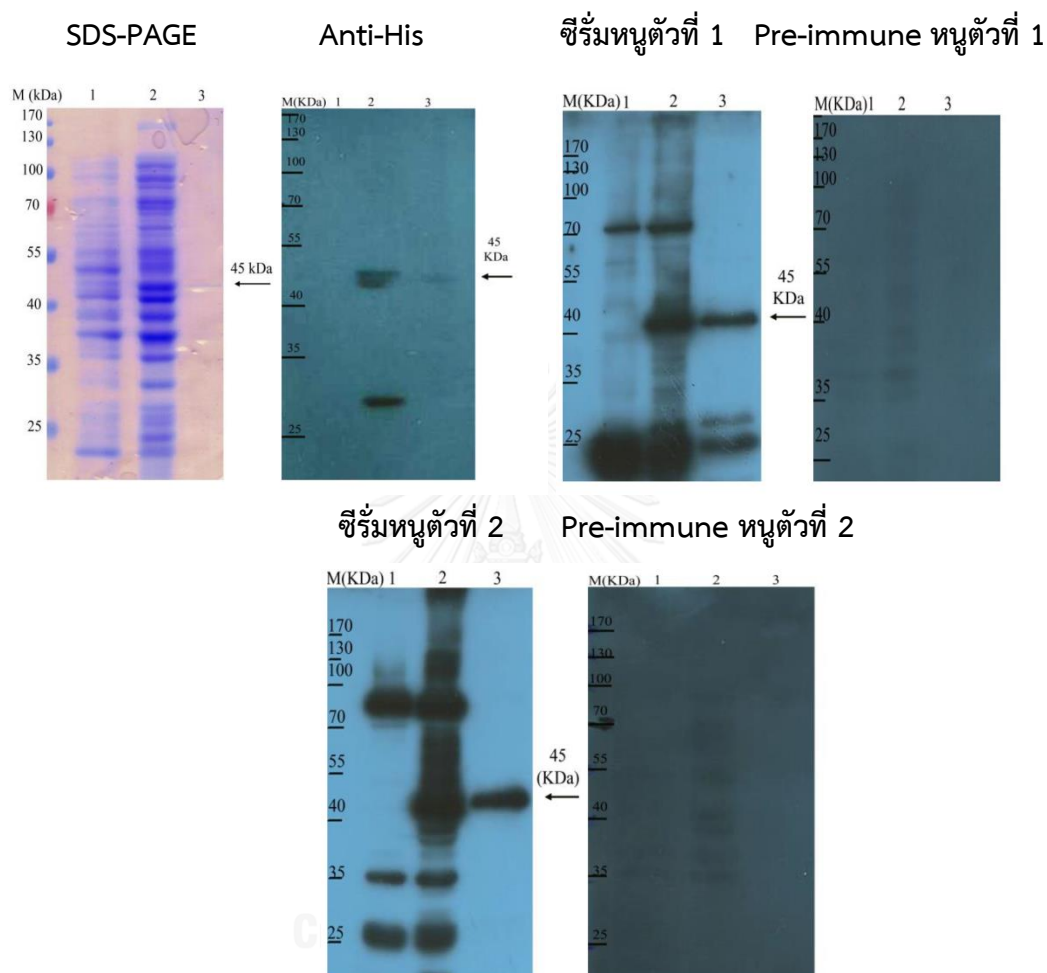
นอกจากการนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60VP1$ สำหรับใช้เป็นแอนติเจนไปใช้ในการพัฒนาวิธี indirect – ELISA เพื่อใช้ตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CAV ยังถูกนำมาใช้เพื่อผลิตพอลิโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60VP1$ สำหรับนำไปใช้ตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิคทางอิมมูโนวิทยาโดยได้นำรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60VP1$ บริสุทธิ์ที่ผ่านกระบวนการ dialysis และละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ PBS ไปฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูไมซ์ จำนวน 2 ตัว โดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60VP1$ ในปริมาณ 10 ไมโครกรัมต่อครั้งของการฉีดผสมกับสาร adjuvant ที่เหมาะสม ฉีดกระตุ้นเป็นจำนวน 3 ครั้ง โดยเก็บเลือดจากทางก่อนการฉีดกระตุ้น (pre-immune) เพื่อใช้เป็นซีรัมควบคุมลบของการทดสอบและเก็บเลือดจากหนูภายหลัง 1 สัปดาห์เมื่อได้รับการกระตุ้น ซีรัมจากเลือดหนูได้ถูกนำไปทดสอบด้วยวิธี indirect ELISA ตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 4.6.2 โดยทำการเจือจางซีรัมหนูเป็น 2 เท่าลดลงตามลำดับ ตั้งแต่ระดับการเจือจางที่ 1:1,000 ถึง 2,048,000 สำหรับใช้เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ และใช้สารคอนจูเกตเป็น horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG สำหรับเป็นตัวติดตาม

จากการทดลองดังกราฟรูปที่ 5.51A และ 5.51B พบผลการตอบสนองต่อการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60VP1$ ของหนูตัวที่ 1 และ 2 โดยหนูตัวที่ 2 เริ่มมีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันด้วยการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60VP1$ ได้ตั้งแต่ภายหลังการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 2 และภายหลังการฉีดกระตุ้นครั้งสุดท้ายพบหนูทั้งสองตัวมีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันและสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60VP1$ ซึ่งมีระดับไตเตอร์ของพอลิโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60VP1$ ในหนูตัวที่ 1 และ 2 เท่ากับ 256,000 และ 512,000 ตามลำดับ



รูปที่ 5.45 กราฟแสดงผลการหาระดับไตเตอร์ของพอลิโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60VP1$ A) หนูไม่ซ์ตัวที่ 1 B) หนูไม่ซ์ตัวที่ 2 ด้วยวิธี indirect ELISA

และจากการนำซีรัมจากหนูทั้งสองไปทดสอบความจำเพาะของพอลิโคลนัลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60VP1$ ด้วยวิธี Western blotting analysis ดังแสดงผลในรูปที่ 5.52



รูปที่ 5.46 ผลการทดสอบความจำเพาะของพอลิโคลนัลแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ของหนูไมซ์ ด้วยการวิเคราะห์ SDS-PAGE และ Western blotting analysis

เลน M : Protein Marker (Fermentas, USA)

เลน 1 : รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28- $\Delta 60N_VP1$ ที่ไม่ได้ถูกชักนำด้วย IPTG

เลน 2 : รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28- $\Delta 60N_VP1$ ที่ถูกชักนำด้วย IPTG

เลน 3 : รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ที่บริสุทธิ์

จากผลวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบแถบรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน (kDa) มีปริมาณเพิ่มขึ้น (รูปที่ 5.52, เลน 2) เมื่อเปรียบเทียบกับรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28- $\Delta 60N_VP1$ ที่ไม่ได้ถูกชักนำด้วย IPTG (รูปที่ 5.52, เลน 1) และพบแถบรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ที่ขนาดเดียวกัน (รูปที่ 5.52, เลน 3) สอดคล้องกับผลการทดสอบด้วยวิธี Western blotting analysis เมื่อใช้ Anti-His monoclonal antibody เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิสำหรับตรวจติดตามรีคอมบิแนนท์โปรตีน พบแถบสัญญาณที่ขนาดเดียวกับผล SDS-PAGE ในขณะที่เมื่อใช้พอลิโคลนัลแอนติบอดีจากซีรัมของหนูไมซ์ตัวที่ 1 เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิในวิธี Western blotting analysis พบแถบสัญญาณของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60VP1$ ขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน (kDa) ทั้งในเลน 2 และ 3 เช่นเดียวกัน แต่ไม่พบในเลน 1 อย่างไรก็ตามยังพบแถบสัญญาณที่ไม่จำเพาะที่เกิดขึ้นที่ขนาดอื่นๆ ทั้งในเลน 1, 2 และ 3 เมื่อเปรียบเทียบผล Western blotting analysis โดยใช้พอลิโคลนัลแอนติบอดีจากซีรัมของหนูไมซ์ตัวที่ 2 เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิพบแถบสัญญาณของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60VP1$ ขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน (kDa) เกิดขึ้นทั้งในเลน 2 และ 3 แต่ไม่พบในเลน 1 เช่นเดียวกัน ในขณะที่พบแถบสัญญาณที่ไม่จำเพาะที่เกิดขึ้นที่ขนาดอื่นๆ เฉพาะในเลน 1 และ 2 แต่ไม่พบในเลน 3

จากการทดลองนี้จึงได้พอลิโคลนัลแอนติบอดีที่ผลิตได้จากหนูไมซ์ตัวที่ 2 ซึ่งมีระดับไตเตอร์ 512,000 และมีความจำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60VP1$ อย่างเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ตรวจหาเชื้อไวรัส CAV ด้วยเทคนิคทางอิมมูโนวิทยาต่อไป

บทที่ 6

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

โรคโลหิตจางในไก่ เป็นโรคระบาดซึ่งพบการแพร่ระบาดและกระจายอยู่ทั่วไปในฝูงไก่ การแสดงออกของโรคในลูกไก่สามารถชี้บ่งถึงการแพร่ระบาดของโรคได้ แต่ไม่สามารถชี้บ่งโรคได้ในไก่ที่มีอายุ เนื่องจากไม่มีการแสดงอาการของโรคทำให้การป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อไวรัสก่อโรคโลหิตจางในไก่อันเป็นสาเหตุของโรคในฝูงสัตว์เป็นไปได้ยาก การตรวจวินิจฉัยเพื่อคัดแยกสัตว์ติดเชื้อจึงเป็นสิ่งจำเป็น นอกจากการตรวจหาภูมิคุ้มกันในสัตว์เพื่อคัดกรองแล้วการสร้างภูมิคุ้มกันโดยให้วัคซีนในสัตว์ที่ไม่มีภูมิคุ้มกันเป็นสิ่งสำคัญโดยเฉพาะการสร้างภูมิคุ้มกันในไก่แม่พันธุ์ก่อนช่วงการฟักไข่ ย่อมส่งผลให้สัตว์ได้รับภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดและป้องกันการติดเชื้อได้อย่างเป็นผลดี ซึ่งการกระทำสองอย่างควบคู่กันย่อมส่งผลดีต่อการควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อและป้องกันการเกิดความเสียหายและผลกระทบจากโรคโลหิตจางในไก่นี้ ซึ่งทำให้ไก่มีภูมิคุ้มกันอ่อนแอและอาจติดเชื้ออื่นๆซึ่งก่อโรคระบาดรุนแรงได้ [2]

ปัจจุบันการตรวจหาแอนติบอดีต่อไวรัสในไก่ นิยมใช้เทคนิค Enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) ในการทดสอบเบื้องต้น เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ให้ผลรวดเร็วและทดสอบตัวอย่างปริมาณมากได้ ซึ่งการใช้อนุภาคไวรัสเป็นแอนติเจนพบว่ามีขั้นตอนที่ซับซ้อนและต้นทุนสูง การใช้เทคโนโลยีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเพื่อผลิตโปรตีนแอนติเจนโดยอาศัยสิ่งมีชีวิตอื่นๆ โดยเฉพาะแบคทีเรีย *Escherichia coli* ซึ่งเป็นที่นิยม เนื่องจากสามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณสูง ง่ายและใช้ต้นทุนต่ำ จึงได้ถูกพัฒนา อย่่างไรก็ดีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนแคพซิด หรือ VP1 ของเชื้อไวรัสก่อโรคโลหิตจางในไก่ซึ่งเป็นโปรตีนหลักที่แสดงคุณสมบัติ immunogenicity ได้ดี โดยใช้ระบบการแสดงออกในแบคทีเรีย *E.coli* ยังผลิตได้ในปริมาณน้อย เนื่องจากทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ของแบคทีเรียของโปรตีน VP1 [55], [57] นอกจากนี้ยังโปรตีน VP2 ซึ่งเป็นโปรตีนของไวรัสที่สำคัญโดยมีบทบาทเป็นโปรตีน chaperone หรือ scaffold protein มีส่วนเกี่ยวข้องในการม้วนพับของโปรตีน VP1 ให้เกิดโครงสร้างของอนุภาคไวรัสที่ถูกต้อง [16], [25], [26]

ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP1 และ VP2 ในแบคทีเรีย *E.coli* เพื่อให้ได้แอนติเจนที่เหมาะสมและปริมาณมาก โดยสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน VP1 ซึ่งดัดแปลงให้เป็นยีน $\Delta 60N_VP1$ สำหรับผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ โดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมทำการตัดยีน VP1 บางส่วนซึ่งแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนตั้งแต่ลำดับที่ 1 – 60 ที่อยู่ปลายด้าน N-terminal ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนอาร์จินินเป็นจำนวนมากในบริเวณกรดอะมิโน 50 - 60 ตัวแรก จึงมีคุณสมบัติเป็นประจุบวกและสามารถจับกับ DNA ได้ และเป็นพิษต่อเซลล์

แบคทีเรียออก [55] ตามการศึกษาของ Lee และคณะ (2009) ซึ่งพบว่าการตัดส่วนที่เป็นพิษต่อเซลล์ดังกล่าวออกสามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีน VP1 ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* ให้มากขึ้นได้ [57] นอกจากนี้การที่โปรตีน VP2 สามารถช่วยในการม้วนพับของโปรตีน VP1 [16],[25],[26] จึงได้ทำการออกแบบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดให้มียีน VP2 สำหรับผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 นอกจากนี้ยังทำการตัดต่อพันธุกรรมของยีน VP2 โดยเชื่อมต่อกับยีน VP1 เต็มยีนให้เป็นยีนเดียวกัน สำหรับผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2/Full length VP1 และตัดต่อพันธุกรรมของยีน VP2 ให้เชื่อมต่อกับยีน $\Delta 60N_VP1$ สำหรับผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนอีก 2 ชนิด คือ โปรตีน VP2/ $\Delta 60N_VP1$ และโปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$

จากการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้ง 5 รูปแบบ สำหรับผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP1 และ VP2 ทั้ง 5 ชนิด โดยโคลนชิ้นส่วนยีนทั้งหมดของ VP1 และ VP2 แล้วตัดต่อเข้าสู่ พลาสมิด pET28a (+) จากงานวิจัยนี้สามารถสร้างรีคอมบิแนนท์ได้ทั้งหมด 4 รูปแบบ จาก 5 รูปแบบ ซึ่งไม่สามารถโคลนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET28-VP2/VP1 ได้ เนื่องจากภายหลังการประกอบเป็นชิ้นยีน VP2 เชื่อมต่อกับยีน VP1 เต็มยีน แล้วเคลื่อนย้ายพลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ DH5 α ซึ่งพบโคลนิจของแบคทีเรียเจริญและตายในที่สุด ซึ่งหลายรายงานการศึกษาพบว่ายีน VP1 เต็มยีนสามารถโคลนเข้าสู่พลาสมิดต่างๆ เช่น pET28 [57], pRSET [56] สำหรับผลิตโปรตีน Full length VP1 ในแบคทีเรีย *E.coli* ได้ แต่เนื่องจากการทดลองนี้ได้ทำการเชื่อมต่อยีน VP1 เข้ากับยีน VP2 แสดงถึงยีน VP2 อาจส่งเสริมให้ยีน VP2/VP1 เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรีย *E.coli* ทั้งนี้ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเกิดจากกระบวนการใดเป็นสาเหตุ นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังพบอีกว่าลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากยีน $\Delta 60N_VP1$ และ VP2 ในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีเพียงยีนเดียวต่างจากในรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีทั้งสองยีนเชื่อมต่อกันในบางตำแหน่ง ทั้งนี้อาจเกิดจากความผิดพลาดจากการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ที่มี proof reading ที่ใช้ในปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน จึงเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน VP1 และ VP2 ของเชื้อไวรัสก่อโรคโลหิตจางติดต่อในไก่ในฐานข้อมูล Genbank ต่างกัน ซึ่งผลต่อโครงสร้างของโปรตีนหรือทำให้บางอิพิโทปที่อยู่บนโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ แตกต่างกัน

ในงานวิจัยนี้จึงได้นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้ง 4 รูปแบบข้างต้น เคลื่อนย้ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ Roseta-gami และทำการแสดงออกโดยอาศัย IPTG เป็นสารชักนำที่ตามสภาวะที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนแต่ละชนิดที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้ จากการศึกษาครั้งนี้พบความแตกต่างของระดับการแสดงออกระหว่างรีคอมบิแนนท์โปรตีนเดี่ยว คือ $\Delta 60N_VP1$ และ VP2 กับรีคอมบิแนนท์โปรตีนผสม คือ VP2/ $\Delta 60N_VP1$ และ $\Delta 60N_VP1/VP2$ โดยระดับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ที่เชื่อมต่อกับ VP2 น้อยกว่าระดับการ

แสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ และ VP2 ที่ไม่เชื่อมต่อกัน จากผลดังกล่าวแสดงว่าโปรตีน VP2 ซึ่งมีบทบาทหน้าที่คล้าย chaperone [16] แต่ไม่สามารถช่วยเพิ่มระดับการแสดงออกของโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ได้ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ได้พบว่าทิศทางของการเชื่อมต่อโปรตีน VP2 กับ $\Delta 60N_VP1$ มีผลต่อระดับการแสดงออกและขนาดของโปรตีนโดยพบว่าการเชื่อมต่อโปรตีน VP2 ที่ปลาย N-terminal ของโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ($VP2/\Delta 60N_VP1$) พบระดับการแสดงออกของโปรตีนสูงกว่าการเชื่อมต่อโปรตีน VP2 ทางด้านปลาย C-terminal ของโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ($\Delta 60N_VP1/VP2$) แต่เกิดการย่อยของโปรตีนมากกว่าอาจเนื่องจากการม้วนพับของรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้งสองที่แตกต่างกัน จึงทำให้การถูกย่อยของโปรตีนซึ่งอาจเกิดจากการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสจากเซลล์เจ้าบ้านมากน้อยต่างกัน แสดงถึงการเชื่อมต่อโปรตีน VP2 ที่ปลายด้าน N-terminal ของโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ สามารถส่งเสริมการแสดงออกของโปรตีนได้ดีกว่าการเชื่อมต่อที่ปลายด้าน C-terminal ของโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ นอกจากนี้ยังพบขนาดที่แตกต่างกันของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ และ $VP2/\Delta 60N_VP1$ ซึ่งแปลรหัสจากลำดับกรดอะมิโนที่มีจำนวนเท่ากัน คือ 654 กรดอะมิโน แต่พบว่าโปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ มีขนาด 85 kDa ซึ่งมากกว่าขนาดของรีคอมบิแนนท์โปรตีน $VP2/\Delta 60N_VP1$ ซึ่งมีขนาด 72 kDa ประมาณ 7 kDa โดยขนาดของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นอาจเกิดจากกระบวนการใดกระบวนการหนึ่งของเซลล์เจ้าบ้านซึ่งเป็นโปรคาริโอติกเซลล์หรือเกิดจากอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ กับโปรตีนใดของเซลล์เจ้าบ้านซึ่งมีผลต่อการเพิ่มขนาดของโปรตีน

เมื่อนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดทั้ง 4 ชนิด มาทดสอบคุณสมบัติการละลายของโปรตีนในสารละลาย ENZhance lysis buffer พบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 สามารถละลายได้ดี สอดคล้องกับการศึกษาของ Lee และคณะ (2009) พบว่าโปรตีน VP2 สามารถละลายได้ 80% ของโปรตีน VP2 ทั้งหมดที่มีการแสดงออก ในขณะที่รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ไม่สามารถละลายได้ [57] เนื่องจากค่าเฉลี่ยของประจุต่อเรซิดิวส์ของโปรตีนลดลง [55] และเมื่อนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP2 ที่ละลายได้มาเชื่อมต่อกับโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ที่ไม่ละลายพบว่าไม่สามารถช่วยให้โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ละลายได้ ในขณะที่เดียวกันทำให้โปรตีน VP2 เดิมสามารถละลายได้ดีกลับไม่สามารถละลายได้เมื่อเชื่อมต่อกับโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ จากการศึกษาจึงพบว่าการที่โปรตีน VP2 ไม่สามารถช่วยเพิ่มระดับการละลายของโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ดังนั้นเป็นไปได้ว่าโปรตีน VP2 อาจมีส่วนเกี่ยวข้องเฉพาะในการประกอบโครงสร้างของโปรตีน VP1 ทำให้เกิดอิทธิพลที่ถูกต้องและช่วยในการกระตุ้นการสร้าง neutralizing antibodies ของโปรตีน VP1 [25],[26] อย่างเดียว ดังนั้นรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1/VP2$ และ $VP2/\Delta 60N_VP1$ ทั้งสองจึงเหมาะสมสำหรับพัฒนาเป็นวัคซีนต่อไป

การทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้ง 4 ชนิดให้บริสุทธิ์ในการทดลองนี้ได้ทำการละลายโปรตีนแล้วผ่าน Nickel column chromatography แล้วจะแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ศึกษาออกโดยอาศัยการเพิ่มความเข้มข้นของสาร imidazole ตามลำดับ สำหรับโปรตีน VP2 ซึ่งสามารถละลายได้ง่ายด้วย ENZhanche lysis buffer และถูกทำให้บริสุทธิ์โดยอาศัยความเข้มข้นของสาร imidazole ที่ 100 และ 300 มิลลิโมลาร์ ซึ่งการที่โปรตีน VP2 สามารถถูกแยกออกมาได้ 2 ช่วง อาจเกิดจากการที่มีโปรตีนอื่นๆมารบกวนการจับจึงทำให้โปรตีน VP2 บางส่วนจับกับคอลัมน์ด้วยแรงที่อ่อนกว่าจึงถูกชะออกมาก่อนด้วยความเข้มข้นของ imidazole ที่ต่ำ ส่วนการทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$, $VP2/\Delta 60N_VP1$ และ $\Delta 60N_VP1/VP2$ ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ละลายและอยู่ในรูปของ inclusion bodies บริสุทธิ์นั้นได้นำวิธีการของ Schlager และคณะ (2012) [65] มาประยุกต์ใช้ในการศึกษาโดยอาศัยสาร SDS ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น anionic detergent และสามารถละลายโปรตีนได้เป็นอย่างดี โดย SDS จะสามารถแทรกอยู่ภายในโปรตีนในบริเวณที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic) แล้วเกิดโครงสร้างที่เรียกว่า micelle เกิดขึ้น โดยพบว่าการใช้สาร SDS ในปริมาณสูง 1% สามารถละลายโปรตีนที่อยู่ในตะกอนเซลล์ได้ง่ายและรวดเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สาร chaotropic อื่น เช่น ยูเรีย, กัวนิตินีเยมคลอไรด์ ซึ่งมีขั้นตอนยุ่งยากและใช้เวลานาน อีกทั้งยังสิ้นเปลืองเนื่องจากต้องใช้สารในปริมาณที่มีความเข้มข้นสูง 6-8 โมลาร์ และภายหลังที่โปรตีนถูกทำลายโครงสร้างโปรตีนในบริเวณที่เป็น α -helical ด้วย SDS [66] แล้วอาศัย anionic detergent อีกชนิดหนึ่ง คือ sarkosyl แทน SDS ที่ถูกกำจัดออกด้วยการตกตะกอนในสภาวะเย็นก่อนหน้า โดยการใช้ในปริมาณ sarkosyl น้อย 0.1 % พบว่า นอกจากช่วยให้การละลายของโปรตีนดีขึ้นแล้วยังช่วยในการม้วนพับของโปรตีนให้มีความถูกต้อง [67] ทำให้โปรตีนสามารถกลับมาอยู่ในสภาพเดิมภายหลังการทำให้บริสุทธิ์

ในการศึกษานี้ได้ทำการเลือกรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ เป็นโปรตีนหลักซึ่งเป็นแคปซิดโปรตีนของไวรัสสำหรับนำไปประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาวิธีตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CAV และการผลิตพอลิโคลนัลแอนติบอดี ซึ่งในการศึกษานี้ได้รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ที่บริสุทธิ์และมีปริมาณ 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Soliman และคณะ (2006) ซึ่งได้พัฒนาการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน VP1 ใน *E.coli* โดยอาศัยเวกเตอร์ pRSET สำหรับแสดงออกโปรตีนและใช้ระบบ Batch fermentation ในการผลิตซึ่งได้ปริมาณโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และภายหลังการทดสอบคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนของรีคอมบิแนนท์โปรตีนดังกล่าว พบว่าสามารถเกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสก่อโรคโลหิตจางติดต่อนไกในซีรัมของไกติดเชื้อได้ดี ถึงแม้ว่าในการทดลองนี้ได้ทำการทำลายโครงสร้างของโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ด้วยสาร SDS และทำให้กลับมาม้วนพับของโปรตีนอีกครั้งด้วยสาร sarkosyl ในขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ แต่ยังคงโครงสร้างของอีพิโทปบนโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ไว้ [56] และนอกจากนี้แม้มีการตัดบางส่วนของโปรตีน VP1 ด้านปลาย N-terminal ออกไปถึง 60

กรดอะมิโนออกไปก็ยังคงคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนได้ดี อาจเนื่องจากอพิโทปบางตำแหน่งที่สำคัญยังคงอยู่บนโปรตีน $\Delta 60N_VP1$ เช่น ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 89 ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง neutralizing antibody [68] จากการศึกษาครั้งนี้จึงได้การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ในแบคทีเรีย *E.coli* ที่มีประสิทธิภาพได้รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ที่บริสุทธิ์สูงในปริมาณมาก และมีคุณสมบัติความเป็นแอนติเจนที่ดี

ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้นำรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ บริสุทธิ์ที่ผลิตได้ไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวิธีตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสก่อโรคโลหิตจางในไก่ในตัวอย่างซีรัมด้วยวิธี indirect ELISA โดยพบว่า ประสิทธิภาพของวิธีมีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) รวมทั้งความแม่นยำ (Accuracy) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทดสอบโดยชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูปยี่ห้อ IDEXX ซึ่งใช้เป็นวิธีมาตรฐาน เท่ากับ 87.50%, 95.31% และ 90.79% ตามลำดับ ซึ่งมีความจำเพาะและความแม่นยำสูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี indirect ELISA โดยใช้อุณหภูมิไวรัสเป็นแอนติเจน ซึ่งมีความไวและความจำเพาะรวมทั้งความแม่นยำของวิธี เท่ากับ 93%, 78% และ 86% ตามลำดับ [54] แต่จากการศึกษาของ Soiman และคณะ(2006) ซึ่งสามารถผลิตโปรตีน VP1 จากแบคทีเรีย *E.coli* ได้ และนำโปรตีน full length VP1 มาพัฒนาวิธี indirect ELISA สำหรับตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสก่อโรคโลหิตจางในไก่เช่นกัน พบว่าวิธีดังกล่าวให้ความไวและความจำเพาะเท่ากับ 93.3% และ 100% ตามลำดับ [56] ซึ่งมีความไวและความจำเพาะสูงกว่าวิธี indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้นจากการศึกษาครั้งนี้ ทั้งนี้เนื่องจากผลการตัดบางส่วนของโปรตีน VP1 ด้านปลาย N-terminal ออกไป จำนวน 60 กรดอะมิโน ซึ่งอาจมีอพิโทปอื่นๆของไวรัสที่สำคัญอยู่บริเวณดังกล่าวจึงมีผลทำให้ความไวและความจำเพาะของวิธีต่ำกว่าเมื่อใช้ VP1 เป็นแอนติเจน อย่างไรก็ตามเมื่อประเมินความสอดคล้องของผลการทดสอบจากวิธี indirect ELISA ที่พัฒนาขึ้นกับผลการทดสอบจากชุดทดสอบ ELISA สำเร็จรูปยี่ห้อ IDEXX พบว่า มีความสอดคล้องกันในระดับดีมาก ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงสามารถพัฒนาวิธีตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสก่อโรคโลหิตจางในไก่เบื้องต้นด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้รีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ได้เป็นผลสำเร็จ เหมาะสมสำหรับพัฒนาเป็นชุดทดสอบสำเร็จรูปต่อไป

นอกจากนี้ในการศึกษาครั้งนี้ยังได้นำรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ บริสุทธิ์ที่ผลิตได้ไปประยุกต์ใช้ในการผลิตพอลิโคลนัลแอนติบอดีซึ่งได้ทำการปลุกภูมิคุ้มกันในหนูเม้าส์ จำนวน 2 ตัว โดยในการทดลองนี้ได้ใช้ปริมาณรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ บริสุทธิ์ จำนวน 10 ไมโครกรัมต่อครั้ง ในการฉีดและเลือกใช้สารแอดจูแวนซ์ ได้แก่ Freund's complete adjuvant สำหรับการปลุกภูมิคุ้มกันครั้งแรกและใช้ Freund's incomplete adjuvant สำหรับการปลุกภูมิคุ้มกันครั้งที่ 2 และ 3 โดยพบว่าแอนติเจนที่ใช้ในปริมาณ 10 ไมโครกรัม ผสมกับสารแอดจูแวนซ์ในอัตราส่วน 1:1 สามารถใช้ฉีดกระตุ้นให้หนูสร้างแอนติบอดีจำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ได้

ในการศึกษานี้ได้เลือกใช้หนูโมซัสสำหรับผลิตพอลิโคลนอนแอนติบอดี เนื่องจากเป็นสัตว์ขนาดเล็กจึงใช้ปริมาณโปรตีนแอนติเจนสำหรับปลูกภูมิคุ้มกันน้อยกว่าสัตว์ชนิดอื่นๆที่นิยมใช้ เช่น หนูแรท, กระต่าย เป็นต้น อีกทั้งหนูโมซัสที่สามารถผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนแอนติเจน ยังสามารถนำไปใช้ในการผลิตมอนอโคลนัลแอนติบอดีต่อไปได้ [69] โดยปริมาณแอนติเจนซึ่งอยู่ในรูปของโปรตีนสำหรับใช้ฉีดกระตุ้นในหนูโมซัสที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5- 50 ไมโครกรัม ซึ่งการใช้ปริมาณโปรตีนแอนติเจนในระดับต่ำสามารถช่วยเพิ่มความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้ดี [70] ในการศึกษานี้จึงใช้โปรตีนแอนติเจน 10 ไมโครกรัมต่อครั้งการฉีด พบว่าปริมาณแอนติเจนดังกล่าวเพียงพอและสามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ได้ อย่างไรก็ตามพบว่าหนูโมซัสแต่ละตัวมีความสามารถผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ได้ในระดับไตเตอร์ที่แตกต่างกันเมื่อทำการวัดระดับไตเตอร์ด้วยวิธี indirect ELISA โดยหนูโมซัสตัวที่ 2 สามารถผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ได้ในไตเตอร์ที่ 520,000 ซึ่งสูงกว่าระดับไตเตอร์ของแอนติบอดีจากหนูตัวที่ 1 ซึ่งเท่ากับ 256,000 และพบว่าแอนติบอดีจากหนูตัวที่ 2 ไม่พบการเกิดปฏิกิริยาการจับแบบไม่จำเพาะเมื่อเปรียบเทียบกับหนูตัวที่ 1 จากการศึกษาจึงสามารถผลิตพอลิโคลนัลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ จากหนูโมซัสได้สำเร็จและเหมาะสมสำหรับใช้พัฒนาการตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิคทางอิมมูโนวิทยาตลอดจนการต่อยอดเพื่อผลิตมอนอโคลนัลแอนติบอดีต่อไป

จากการศึกษาทั้งหมดในงานวิจัยนี้จึงได้รีคอมบิแนนท์โปรตีน VP1 และ VP2 ของเชื้อไวรัสโลหิตจางในไก่ที่ผลิตได้ในแบคทีเรีย *E.coli* และสามารถพัฒนาวิธีตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสโลหิตจางในไก่ด้วยวิธี indirect ELISA โดยอาศัยรีคอมบิแนนท์โปรตีน $\Delta 60N_VP1$ ได้อย่างเหมาะสม ตลอดจนสามารถผลิตพอลิโคลนัลแอนติบอดีต่อ VP1 โดยใช้ $\Delta 60N_VP1$ สำหรับใช้ในงานตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสโลหิตจางในไก่ต่อไป

รายการอ้างอิง

1. กรมการค้าต่างประเทศ. 2557 [7 เม.ย 2558]; Available from: http://www.ditp.go.th/contents_attach/84084/84084.pdf
2. Schat K, *Chicken infectious anemia*, in *diseases of poultry*, Saif YM, editor. 2003, Iowa state press: Iowa. p. 182-202.
3. Jakowski RM, Fredrickson TN, Chomiak TW, Luginbuhl RE, *Hematopoietic destruction in Marek's disease*. Avian diseases, 1970. 14: p. 374-385.
4. Yuasa N, *Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks*. Avian diseases, 1979. 23: p. 366-385.
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*. National institute of animal health quarterly, 1983. 23: p. 13-20.
6. Yuasa N, Taniguchi T, Imada T, Hihara H, *Distribution of chicken anemia agent (CAA) and detection of neutralizing antibody in chicks experimentally inoculated with CAA*. National institute of animal health quarterly, 1983. 23(3): p. 78-81.
7. Bulow VV, *Avian infectious anemia and related syndromes caused by chicken anemia virus*. Critical reviews in poultry biology, 1991. 3: p. 1-17.
8. McConnell CD, Adair BM, McNulty MS, *Effects of chicken anemia virus on cell-mediated immune function in chickens exposed to the virus by a natural route*. Avian diseases, 1993. 37(2): p. 366-374.
9. Bulow VV, Fuchs B, Vielitz E, Landgraf H, *Early mortality syndrome in chickens following double infection with Marek's disease virus and chicken anemia agent*. Zentralblatt fur veterinarmedizin reihe B journal of veterinary medicine series B, 1983. 30: p. 742-750.
10. Bulow VV, Rudolph R, Fuchs B, *Enhanced pathogenicity of chicken anemia agent (CAA) in dual infections with Marek's disease virus (MDV), infectious bursal disease virus (IBDV) or reticuloendotheliosis virus (REV)*. Zentralblatt fur

- veterinarmedizin reihe B journal of veterinary medicine series B, 1986. 33: p. 93-116.
11. Otaki Y, Tajima M, Saito K, Nomura Y, *Immune response of chicks inoculated with chicken anemia agent alone or in combination with Marek's disease virus or turkey herpesvirus*. The Japanese journal of veterinary science, 1988. 50: p. 1040-1047.
 12. de Boer GF, van Roozelaar J, Moorman RJ, Jeurissen SH, van den Wijngaard JC, Hilbink F, Koch G, *Interaction between chicken anemia virus and live Newcastle disease vaccine*. Avian pathology, 1994. 23: p. 263 – 275.
 13. Cloud SS, Lillehoj HS, Rosenberger JK, *Immune dysfunction following infection with chicken anemia agent and infectious bursal disease virus. I. Kinetic alterations of avian lymphocyte subpopulations*. Veterinary immunology and immunopathology, 1992. 34: p. 337-352.
 14. de Herdt P, van den Bosch G, Ducatelle R, Uyttebroek E, Schrier C, *Epidemiology and significance of chicken infectious anemia virus infections in broilers and broiler parents under nonvaccinated European circumstances*. Avian diseases, 2001. 45: p. 706-708.
 15. Biagini P, Bendinelli M, Hino S, Kakkola L, Mankertz A, Niel C, Okamoto H, Raidal S, Teo CG, Todd D, *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. 2012: Elsevier academic press. p. 343-349.
 16. Davidson I, Shulman LM, *Unraveling the puzzle of human anellovirus infections by comparison with avian infections with the chicken anemia virus*. Virus research, 2008. 137: p. 1-15.
 17. *Gyrovirus*. [1 April 2015]; Available from: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/117.html.
 18. Kamada K, Kuroishi A, Kamahora T, Kabat P, Yamaguchi S, Hino S, *Spliced mRNAs detected during the life cycle of chicken anemia virus*. The journal of general virology, 2006. 87: p. 2227-2233.
 19. Noteborn MH, Koch G, *Chicken anemia virus infection: molecular basis of pathogenicity*. Avian pathology, 1995. 24: p. 11-31.

20. Okamoto H, Mayumi M, *TT virus: virological and genomic characteristics and disease associations*. Journal of gastroenterology, 2001. 36: p. 519-529.
21. Claessens JA, Schrier CC, Mockett AP, Jagt EH, Sondermeijer PJ *Molecular cloning and sequence analysis of the genome of chicken anemia agent*. The journal of general virology, 1991. 72: p. 2003-2006.
22. Ilyina TV, Koonin EV, *Conserved sequence motifs in the initiator proteins for rolling circle DNA replication encoded by diverse replicons from eubacteria, eucaryotes and archaebacteria*. Nucleic acids research, 1992. 20: p. 3279-3285.
23. Renshaw RW, Soine C, Weinkle T, Connell PH, Ohashi K, Watson S, Lucio B, Harrington S, Schat KA, *A hypervariable region in VP1 of chicken infectious anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture*. Journal of virology, 1996. 70: p. 8872-8878.
24. Peters MA, Jackson DC, Crabb BS, Browning GF, *Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase*. The journal of biological chemistry, 2002. 277: p. 39566-39573.
25. Koch G, van Roozelaar J, Verschueren CAJ, van der eb AJ, Noteborn MH, *Immunogenic and protective properties of chicken anemia virus proteins expressed by baculovirus*. Vaccine, 1995. 13: p. 763-770.
26. Noteborn MH, Verschueren CAJ, Koch G, van der Eb AJ, *Simultaneous expression of recombinant baculovirus-encoded chicken anemia virus (CAV) proteins VP1 and VP2 is required for formation of the CAV-specific neutralizing epitope*. Journal of general virology, 1998a. 79: p. 3073-3077.
27. Noteborn MH, van Danen OA, van der Eb AJ, *Chicken anemia virus: Induction of apoptosis by a single protein of a single-stranded DNA virus*. Semina virology, 1998b. 8: p. 497-504.
28. Noteborn M, *Chicken anemia virus induced apoptosis: underlying molecular mechanisms*. Veterinary microbiology, 2004. 98: p. 89-94.
29. Yuasa N, *Effect of chemicals on the infectivity of chicken anemia virus*. Avian pathology, 1992. 21: p. 315-319.

30. Adair B, *Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection*. Developmental and comparative immunology, 2000. 24: p. 247-255.
31. Miller MM, Schat KA, *Chicken infectious anemia virus: an example of the ultimate host-parasite relationship*. Avian diseases, 2004. 48: p. 734-745.
32. McNulty M, *Chicken anemia agent: a review*. Avian pathology, 1991. 20: p. 187-203.
33. Smyth JA, Moffett DA, McNulty MS, Todd D, Mackie DP, *A sequential histopathologic and immunocytochemical study of chicken anemia virus infection at one day of age*. Avian diseases, 1993. 37: p. 324-338.
34. Jeurissen SH, Janse ME, van Roozelaar J, Koch G, de Boer GF, *Susceptibility of thymocytes for infection by chicken anemia virus is related to pre- and posthatching development*. Developmental immunology, 1992. 2: p. 123-129.
35. Hoop RK, Reece RL, *The use of immunofluorescence and immunoperoxidase staining in studying the pathogenesis of chicken anemia agent in experimentally infected chickens*. Avian pathology, 1991. 20: p. 349-355.
36. Hoop R, *Transmission of chicken anemia virus with semen*. The veterinary record, 1992. 133: p. 551-552.
37. Yuasa N, Yoshida I, *Experimental egg transmission of chicken anemia agent*. National institute of animal health quarterly, 1983. 23: p. 99-100.
38. Saini NS, Dandapat A, *Diagnosis and molecular characterization of chicken anemia virus*. Veterinary world, 2009. 2: p. 156-160.
39. Goryo M, Suwa T, Matsumoto S, Umemura T, Itakura C, *Serial propagation and purification of chicken anemia agent in MDCC-MSB1 cell line*. Avian pathology, 1987. 16: p. 149-163.
40. McNulty MS, Connor TJ, McNeilly F, Kirkpatrick KS, McFerran JB, *A serological survey of domestic poultry in the United Kingdom for antibody to chicken anemia agent*. Avian pathology, 1988. 17: p. 315-324.
41. Calnek BW, Lucio B, Cardona C, Harris RW, Schat KA, Buscaglia C, *Comparative susceptibility of Marek's disease cell lines to chicken infectious anemia virus*. Avian diseases, 2000. 44: p. 114-124.

42. Todd D, Creelan JL, McNulty MS, *Dot blot hybridization assay for chicken anemia agent using a cloned DNA probe*. Journal of clinical microbiology, 1991. 29: p. 933-939.
43. Allan GM, Smyth JA, Todd D, McNulty MS, *In situ hybridization for the detection of chicken anemia virus in formalin-fixed, paraffin-embedded sections*. Avian diseases, 1993. 37: p. 177-182.
44. Huang CH, Lai GH, Lee MS, Lin WH, Lien YY, Hsueh SC, Kao JY, Chang WT, Lu TC, Lin WN, Chen HJ, Lee MS, *Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of chicken anemia virus*. Journal of applied microbiology, 2010. 108: p. 917-924.
45. Tham KM, Stanislawek WL, *Polymerase chain reaction amplification for direct detection of chicken anemia virus DNA in tissues and sera*. Avian diseases, 1992. 36: p. 1000-1006.
46. Kataria JM, Suresh RP, Verma KC, Toroghi R, Kumar NS, Kataria RS, Sah RL, *Chicken infectious anemia (CIA) in India: detection of the agent by polymerase chain reaction and transmission study*. Indian journal of comparative microbiology, immunology and infectious diseases, 1999. 20: p. 91-95.
47. Brentano L, Mores N, Wentz I, Chandratilleke D, Schat KA, *Isolation and identification of chicken infectious anemia virus in Brazil*. Avian diseases, 1991. 35: p. 793-800.
48. Yamaguchi S, Kaji N, Munang'andu HM, Kojima C, Mase M, Tsukamoto K, *Quantification of chicken anemia virus by competitive polymerase chain reaction*. Avian pathology, 2000. 29: p. 305-310.
49. Markowski-Grimsrud CJ, Schat KA, *Infection with chicken anemia virus impairs the generation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes*. Immunology, 2003. 109: p. 283-294.
50. Caterina KM, Frasca S, Girshick T, Khan MI, *Development of a multiplex PCR for detection of avian adenovirus, avian reovirus, infectious bursal disease virus, and chicken anemia virus*. Molecular and cellular probes, 2004. 18: p. 293-298.

51. Simone S, Carlos AL, Lauricio LR, e Cláudio WC, *A nested-PCR protocol for detection of the chicken anemia virus*. Pesquisa veterinária brasileira, 2005. 25: p. 106-110.
52. Bulow W, Fuchs B, Bertram M, *Untersuchungen über den Erreger der Infektiösen Anämie bei Hühnerküken (CAA) in vitro: Vermehrung, Titration, Serum neutralisationstest und indirekter Immunofluoreszenstest*. Journal of veterinary medicine B, 1985. 32: p. 679-693.
53. Otaki Y, Saito K, Tajima M, Nomura Y, *Detection of antibody to chicken anemia agent: A comparison of three serological tests*. Avian pathology, 1991. 20: p. 315-324.
54. Chansiripornchai N, Pongthanes S, Chanshipornchai P, Wanasawaeng W, *Development of enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against chicken infectious anemia Virus*. Thai journal of veterinary medicine, 2013. 43: p. 353-357.
55. Pallister J, Fahey KJ, Sheppard M, *Cloning and sequencing of the chicken anemia virus (CAV) orf-3 gene, and the development of an ELISA for the detection of serum antibody to CAV*. Veterinary microbiology, 1994. 39: p. 167-178.
56. Soliman IO, Lila MA, Saad MZ, Rahim RA, *Production of a recombinant VP1 protein of the chicken anemia virus for the development of an enzyme-linked immunosorbent assay*. Journal of food, agriculture and environment, 2006. 4: p. 50 - 55.
57. Lee MS, Lien YY, Feng SH, Huang RL, Tsai MC, Chang WT, Chen HJ, *Production of chicken anemia virus (CAV) VP1 and VP2 protein expressed by recombinant Escherichia coli*. Process biochemistry, 2009. 44: p. 390-395.
58. Lee MS, Hseu YC, Lai GH, Chang WT, Chen HJ, Huang CH, Lee MS, Wang MY, Kao JY, You BJ, Lin WH, Lien YY, Lin MK, *High yield expression in a recombinant E. coli of a codon optimized chicken anemia virus capsid protein VP1 useful for vaccine development*. Microbial cell factories, 2011. 10 p. 1-11.

59. Lacorte C, Lohuis H, Goldbach R, Prins M, *Assessing the expression of chicken anemia virus proteins in plants*. *Virus research*, 2007. 129: p. 80-86.
60. Lien YY, Huang CH, Sun FC, Sheu SC, Lu TC, Lee MS, Hsueh SC, Chen HJ, Lee MS, *Development and characterization of a potential diagnostic monoclonal antibody against capsid protein VP1 of the chicken anemia virus*. *Journal of veterinary science*, 2012. 13: p. 73-79.
61. Levenhagen MA, Fabiana AS, Fujimura PT, Caneiro AP, Costa-Cruz JM, Goulart LR, *Structural and functional characterization of a novel scFv anti-HSP60 of Strongyloides sp.* *Scientific reports*, 2015. 5: p. 1-9.
62. Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD, *Principals and practical application of the receiver operating characteristic analysis for diagnostic tests*. *Preventive veterinary medicine*, 2000. 45: p. 23-41.
63. Vihinen M, *How to evaluate performance of prediction methods? Measures and their interpretation in variation effect analysis*. *BMC genomics*, 2012. 13: p. 1-10.
64. Landis JR, Koch G, *The measurement of observer agreement for categorical data*. *Biometrics*, 1977. 33: p. 159-174.
65. Schlager B, Straessle A, Hafen E, *Use of anionic denaturing detergents to purify insoluble proteins after overexpression*. *BMC biotechnology*, 2012. 12: p. 2-7.
66. Michaux C, Pomroy NC, Prive GG, *Refolding SDS-denatured proteins by the addition of amphipathic cosolvents*. *Journal of molecular biology*, 2008. 375: p. 1477-1488.
67. Burgess RR, Deutscher MP, *Methods in enzymology*. 2009: Burlington VT. p. 259-282.
68. Todd D, Scott AN, Ball NW, Borghmans BJ, Adair BM, *Molecular basis of the attenuation exhibited by molecularly cloned highly passaged chicken anemia virus isolates*. *Journal of virology*, 2002. 76: p. 8472-8474.
69. Hanly WC, Artwohl JE, Bennett BT, *Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry*. *Institute for laboratory animal research journal*, 1995. 37: p.:93-118.

70. Harlow E, Lane D, *Antibodies: a laboratory manual*. 1988, New York: Cold spring harbor laboratory press. p. 151-152.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและแข็ง Luria-Bertani (LB broth และ LB agar)

ซึ่งสารดังต่อไปนี้

ทริปโตน (tryptone)	8	กรัม (1% w/v)
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	4	กรัม (0.5% w/v)
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8	กรัม (1% w/v)
วุ้น (agar) (เฉพาะเตรียม LB agar)	12	กรัม

ละลายสารทั้ง 3 ชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 600 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสด้วยสารละลาย 1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เป็น 7.2 จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 800 มิลลิลิตรนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและแข็ง Luria-Bertani (LB broth และ LB agar) ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมอาหารเช่นเดียวกับข้อ 1 หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาทีทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 55° ซ แล้วจึงเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (ampicillin) ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและแข็ง Luria-Bertani (LB broth และ LB agar) ที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล 34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมอาหารเช่นเดียวกับข้อ 1 หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 55° ซ แล้วจึงเติมยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอลและกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 34 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. กลีเซอรอล 80%

นำ 87% กลีเซอรอล ปริมาตร 92 มิลลิลิตร ผสมน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 8 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำอีกครั้ง

2. สารละลายโซเดียมอะซิเตต เข้มข้น 3 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบส 5.2

ซิงโซเดียมอะซิเตต จำนวน 201 กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 400 มิลลิลิตร นำไปปรับความเป็นกรด-เบส 5.2 ด้วยกรดอะซิติก ปริมาตรประมาณ 57 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที

3. สารละลายผสม dNTPs ความเข้มข้นของแต่ละนิวคลีโอไทด์ 10 มิลลิโมลาร์

ผสม dATP, dGTP, dCTP และ dTTP ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อชนิดนิวคลีโอไทด์ ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อให้เป็น 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20° ซ

4. สารละลายบัฟเฟอร์ 50x Tris-acetate (TAE)

ผสมสารดังต่อไปนี้

Trisma base ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$)	121	กรัม
กรดอะซิติก (Gracial acetic acid)	28.55	มิลลิลิตร
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์	50	มิลลิลิตร

ละลายสารผสมในน้ำปลอดประจุปริมาตร 300 มิลลิลิตร ผสมให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที

5. 6x Loading dye

ผสมสารดังต่อไปนี้

Bromophenol blue	0.25	กรัม
Glycerol	4	มิลลิลิตร

ละลายสารผสมในน้ำปลอดประจุปลอดเชื้อปริมาตร 6 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4° ซ

6. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1.5 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบส 8.8

ชั่ง Tris base ($C_4H_{11}NO_3$) 121.1 กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุปริมาตร 600 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-เบส 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 800 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที

7. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบส 6.8

ชั่ง Tris base ($C_4H_{11}NO_3$) 121.1 กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุปริมาตร 600 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-เบส 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 800 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที

8. สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ ความเป็นกรด-เบส 8.5

ชั่ง Tris base ($C_4H_{11}NO_3$) 121.1 กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุปริมาตร 600 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-เบส 8.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 800 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที

9. สารละลาย 10% sodium dodecyl sulfat (SDS)

ชั่ง sodium dodecyl sulfat 10 กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุปริมาตร 80 มิลลิลิตร ผสมให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที

10. สารละลาย 10% แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate)

ชั่งแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต 100 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดไมโครพิวจ์ที่ปราศจากเชื้อ ละลายในน้ำปลอดประจุปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้ละลายจนหมด

11. 4x Sample buffer

ผสมสารดังต่อไปนี้

87% กลีเซอรอล	2.29	มิลลิลิตร
สารละลาย Tris-HCl ความเป็นกรด-เบส 6.8	1	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	2.71	มิลลิลิตร
Bromphenol blue	0.001	กรัม
10% SDS	4	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากันและนำไปเก็บรักษาไว้ที่ 4° ซ ก่อนนำมาใช้ให้ผสมสาร 2-mercaptoethanol ลงไปด้วย ในอัตราส่วนของสารละลายผสมต่อสาร 2-mercaptoethanol เท่ากับ 950 ไมโครลิตร ต่อ 50 ไมโครลิตร

12. 10x SDS running buffer

ซึ่งสารดังต่อไปนี้

Tris base ($C_4H_{11}NO_3$)	30 กรัม
ไกลซีน (Glycine)	144 กรัม
SDS	10 กรัม

แยกละลายสารแต่ละชนิดด้วยน้ำกลั่น จากนั้นจึงนำมาผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ภายหลัง แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ก่อนใช้งานให้นำมาเจือจางด้วยน้ำปลอดประจุให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1x

13. Staining solution

ผสมสารดังต่อไปนี้

Commassie Blue R-255	2 กรัม
เมทานอล (methanol)	450 มิลลิลิตร
กรดอะซิติก (glacial acetic acid)	250 มิลลิลิตร

เมื่อผสมสารทั้ง 3 ชนิดเข้ากันดีแล้ว ให้ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

14. Destaining solution

ผสมสารดังต่อไปนี้

เมทานอล (methanol)	500 มิลลิลิตร
กรดอะซิติก (glacial acetic acid)	100 มิลลิลิตร

เมื่อผสมสารทั้ง 2 ชนิดเข้ากันดีแล้ว ให้ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

15. Fixing solution

ผสมสารดังต่อไปนี้

เมทานอล (methanol)	100 มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น (glacial acetic acid)	100 มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	50 มิลลิลิตร

เมื่อผสมสารทั้ง 3 ชนิดเข้ากันดีแล้ว ให้ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

16. 10x Transfer buffer

ซังสารดังต่อไปนี้

Tris base ($C_4H_{11}NO_3$)	19.3 กรัม
ไกลซีน (Glycine)	90 กรัม

ละลายสารด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 800 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ก่อนใช้งานให้นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1x

17. Transfer blotting buffer

ผสมสารดังต่อไปนี้

10 x Transfer buffer	20 มิลลิลิตร
เมทานอล (methanol)	40 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	140 มิลลิลิตร

เก็บรักษาไว้ที่ 4° ซ

18. 1x PBS หรือ 1x dialysis buffer สำหรับเตรียมโปรตีนแอนติเจนในการผลิตพอลิโคลนัล แอนติบอดี

ผสมสารดังต่อไปนี้

NaCl	80	กรัม
KCl	2	กรัม
Na ₂ HPO ₄	14.4	กรัม
KH ₂ PO ₄	2.4	กรัม

ละลายสารผสมในน้ำกลั่น ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-เบส 7.4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ ปลอดประจุให้ได้ปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที

19. PBST (0.5% Tween – PBS)

ผสมสารดังต่อไปนี้

10 x PBS	50	มิลลิลิตร
Tween 20	250	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	450	มิลลิลิตร

เก็บรักษาไว้ที่ 4° ซ

20. Blocking solution (5% skim milk) สำหรับวิธี Western blotting analysis

ผสมสารดังต่อไปนี้

PBST (0.5% Tween – PBS)	100	มิลลิลิตร
skim milk	5	กรัม

ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน และเก็บรักษาไว้ที่ 4° ซ ขณะที่ยังไม่ใช้งาน และควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง ก่อนใช้งาน

21. ซับสเตรท (substrate) สำหรับวิธี Western blotting analysis

21.1 Solution A

ผสมสารดังต่อไปนี้

100 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl (pH8.5)	2.5	มิลลิลิตร
90 มิลลิโมลาร์ Coumaric acid	11	ไมโครลิตร
250 มิลลิโมลาร์ Luminol	25	ไมโครลิตร

ละลายให้เข้ากัน ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งานและเก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิเย็น
ไม่ใช้งาน

21.2 Solution B

ผสมสารดังต่อไปนี้

100 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl (pH8.5)	2.5	มิลลิลิตร
30% H ₂ O ₂	1.5	ไมโครลิตร

ละลายให้เข้ากัน ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งานและเก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิเย็น
ไม่ใช้งาน

22. สารละลาย Na₂HPO₄ เข้มข้น 1 โมลาร์

ชั่ง Na₂HPO₄ 178 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่ง
ฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที

23. สารละลาย NaH₂PO₄ เข้มข้น 1 โมลาร์

ชั่ง NaH₂PO₄ 138 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่ง
ฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที

24. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบส 7.4

ผสมสารดังต่อไปนี้

Na_2HPO_4 เข้มข้น 1 โมลาร์ 774 มิลลิลิตร

NaH_2PO_4 เข้มข้น 1 โมลาร์ 226 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-เบส 7.4 แล้วนำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

25. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีคุณสมบัติในการละลายให้บริสุทธิ์

25.1 10X SP working buffer

ผสมสารดังต่อไปนี้

สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 โมลาร์ 40 มิลลิลิตร

NaCl 58.44 กรัม

น้ำกลั่น 1,960 มิลลิลิตร

ก่อนใช้งานให้นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1x

25.2 SP binding buffer

ผสมสารดังต่อไปนี้

1X SP working buffer 1,000 มิลลิลิตร

Triton X - 100 5 มิลลิลิตร

จากนั้นนำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

25.3 SP elution buffer (1 โมลาร์ imidazole ใน SP binding buffer)

ผสมสารดังต่อไปนี้

imidazole	17 กรัม
SP binding buffer	250 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันจะได้ SP elution buffer ที่มีสาร imidazole ความเข้มข้น 1 โมลาร์ แล้วนำไปเจือจางด้วย SP binding buffer ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ imidazole เท่ากับ 40, 60, 100, 200 และ 300 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำไปล้างซ้ำ เชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที

25.4 SP strip buffer

ผสมสารดังต่อไปนี้

1X SP working buffer	50 มิลลิลิตร
EDTA 0.5 โมลาร์	50 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	400 มิลลิลิตร

จากนั้นนำไปล้างซ้ำเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที

26. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับการทำรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ละลายให้บริสุทธิ์

26.1 10X PC working buffer หรือ 10x dialysis buffer สำหรับเตรียมโปรตีน

แอนติเจนในวิธี indirect ELISA

ผสมสารดังต่อไปนี้

สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 โมลาร์	80	มิลลิลิตร
NaCl	165.88	กรัม
KH ₂ PO ₄ 1 โมลาร์	14	มิลลิลิตร
KCl	1.94	กรัม
น้ำกลั่น	906	มิลลิลิตร

ก่อนใช้งานให้นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1x

26.2 PCL lysis buffer

ผสมสารดังต่อไปนี้

10X PC working buffer	18	มิลลิลิตร
SDS	2	กรัม
น้ำกลั่น	182	มิลลิลิตร

จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปใช้งานให้เติม DTT ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์

26.3 PCW binding buffer

ผสมสารดังต่อไปนี้

1X PC working buffer	1,000	มิลลิลิตร
sarkosyl	1	กรัม

จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที

26.4 PCE elution buffer (1 โมลาร์ imidazole ใน PCW binding buffer)

ผสมสารดังต่อไปนี้

imidazole	17	กรัม
PCW binding buffer	250	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันจะได้ PCW elution buffer ที่มีสาร imidazole ความเข้มข้น 1 โมลาร์ แล้วนำไปเจือจางด้วย PCW binding buffer ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ imidazole เท่ากับ 40, 60, 100, 200 และ 300 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที

26.5 PC strip buffer

ผสมสารดังต่อไปนี้

1X PC working buffer	50	มิลลิลิตร
EDTA 0.5 โมลาร์	50	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	400	มิลลิลิตร

จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที

27. 1% EDTA

ผสมสารดังต่อไปนี้

EDTA	2	กรัม
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที

28. สารละลาย NaHCO_3 เข้มข้น 1 โมลาร์

ชั่ง NaHCO_3 25.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที

29. สารละลาย Na_2CO_3 เข้มข้น 1 โมลาร์

ชั่ง Na_2CO_3 31.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที

30. Coating buffer ค่าความเป็นกรด-เบส 9.6

ผสมสารดังต่อไปนี้

NaHCO ₃ เข้มข้น 1 โมลาร์	17.92 มิลลิลิตร
Na ₂ CO ₃ เข้มข้น 1 โมลาร์	9.52 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	600 มิลลิลิตร

จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-เบส 9.6 แล้วปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 800 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที

31. Blocking buffer (1% skim milk) สำหรับวิธี indirect ELISA

ผสมสารดังต่อไปนี้

PBST	10 มิลลิลิตร
skim milk	1 กรัม
น้ำกลั่น	90 มิลลิลิตร

ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน และเก็บรักษาไว้ที่ 4° ซ ขณะที่ยังไม่ใช้งาน และควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง ก่อนใช้งาน

32. 10x TMB buffer เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบส 4.0

ผสมสารดังต่อไปนี้

Tripotassium citrate monohydrate	523 มิลลิกรัม
กรดซิตริก (citric acid)	315.04 กรัม
น้ำกลั่น	800 มิลลิลิตร

จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-เบส 4.0 ด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 800 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที ก่อนใช้งานให้นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1x

33. TMB solution

ผสมสารดังต่อไปนี้

3,3',5,5' - tetramethyl-benzidine (TMB) 2.5 มิลลิกรัม

DMSO 250 ไมโครลิตร

ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ในที่มีดขณะที่ยังไม่ใช้งาน

34. TMB substrate

ผสมสารดังต่อไปนี้

TMB solution 250 ไมโครลิตร

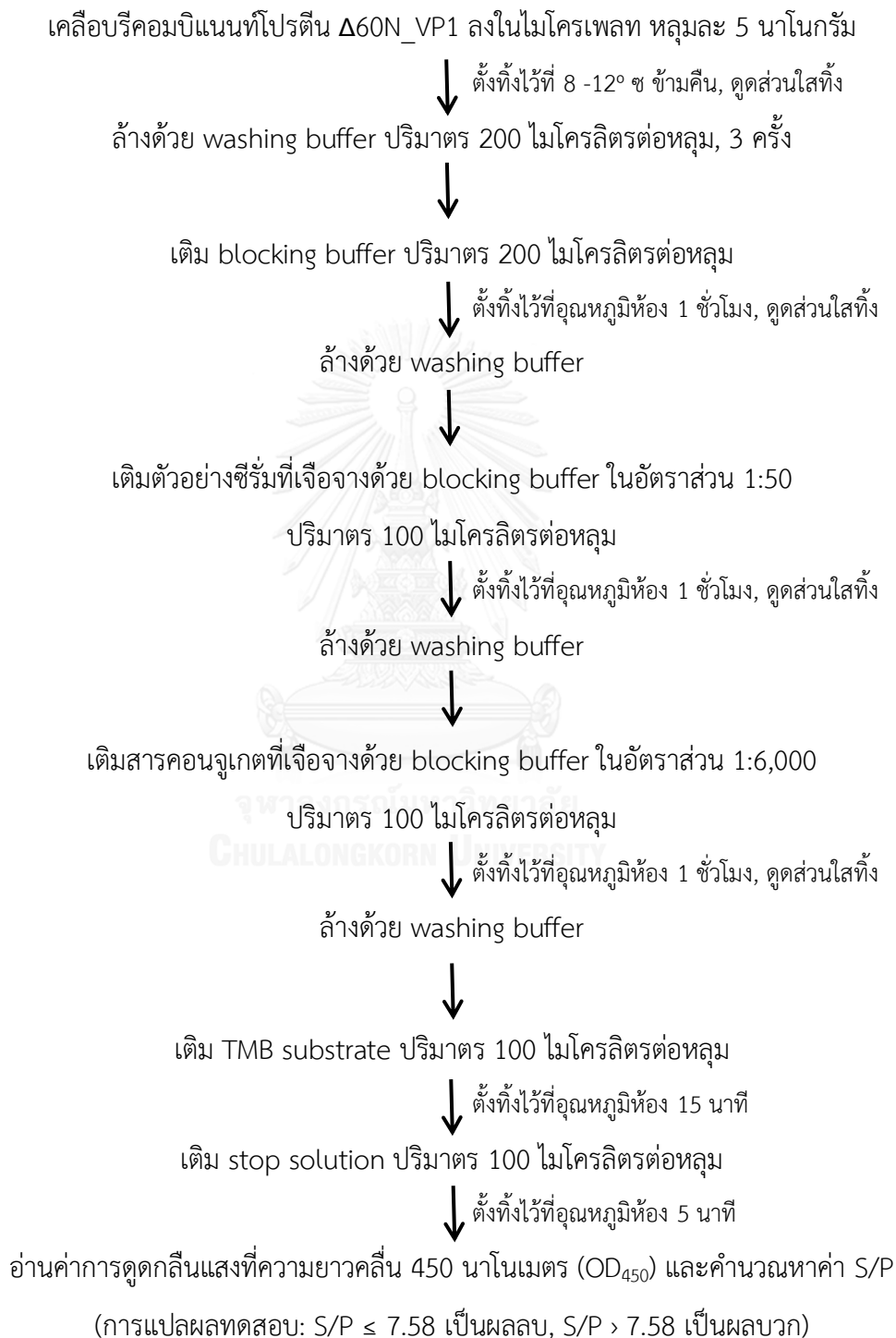
30% H_2O_2 2.5 ไมโครลิตร

1x TMB buffer 10 มิลลิลิตร

ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ในที่มีดที่ 4°C ขณะที่ยังไม่ใช้งาน35. Stop solution (1 N H_2SO_4)เติม H_2SO_4 เข้มข้น ปริมาตร 27.5 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

ภาคผนวก ค

ขั้นตอนการตรวจหาแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CAV ด้วยวิธี indirect ELISA



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล นางสาวศรุดา หวังอนุรักษ์กุล

วัน/เดือน/ปีเกิด 19 พฤศจิกายน 2526

สถานที่เกิด จังหวัดนครสวรรค์

ประวัติการศึกษา

พ.ศ 2544 – พ.ศ. 2548

ปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.)

สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ 2554 – พ.ศ. 2557

ปริญญาโทวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วท.ม.)

สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลงานทางวิชาการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปี พ.ศ. 2557 นำเสนอผลงานวิชาการในรูปแบบโปสเตอร์

เรื่อง Expression and purification of recombinant $\Delta 60VP1$ chicken anemia virus protein in *Escherichia coli* by anionic denaturing detergents. ในงานประชุมวิชาการ The 15th IUBMB-24th FAOBMB-TSBMB Conference Proceedings ณ ประเทศไต้หวัน