



รายงานวิจัย

เรื่อง

การศึกษาคุณสมบัติของ recombinant HA protein ของไวรัส Influenza (H5N1) ผลิตจากเซลล์แมลงและการขยายขนาดการผลิตในถังหมัก 2.5 ลิตร (โครงการต่อเนื่อง ระยะที่ 2)

Characterization of Recombinant HA protein of Influenza virus (H5N1) from insect cells and production in 2.5 L bioreactor (Phase II)

ผู้จัดทำ

ผศ.ดร.เพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง

ผศ.ดร.กนกวรรณ พุ่มพุทรา

ดร.แสงชัย เอกประทุมชัย

นายไวรุจน์ เดชมหิตกุล

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

83 หมู่ 8 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150 โทร 02-4707498-01

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2553

ตุลาคม 2553-กันยายน 2554

งบประมาณ 768,000 บาท

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัย จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2553 คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดลที่ให้ความอนุเคราะห์ HA gene ของไวรัสอินฟลูเอนซา A (H5N1) และ monoclonal antibody ในการใช้ตรวจสอบ recombinant HA protein

## บทคัดย่อ

การระบาดของไวรัส Influenza (H5N1) ในสัตว์ปีก และรายงานการติดเชื้อสายพันธุ์นี้จากสัตว์ปีกไปสู่คนในช่วงระหว่างปี ค.ศ. 2004-2005 ก่อให้เกิดความกังวลไปทั่วโลกว่าไวรัสสายพันธุ์นี้อาจเกิดกลายพันธุ์และสามารถแพร่เชื้อระหว่างมนุษย์ อาจทำให้เกิดเกิดการระบาดไปทั่วโลก (pandemic) การใช้วัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อกรณีมีการระบาดเกิดขึ้น เป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งจะช่วยลดความสูญเสียต่อชีวิตและทรัพย์สินของประชากรโลกได้ การผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัสในปัจจุบันเป็นการผลิตไวรัส ซึ่งต้องมีการป้องกันการแพร่ของเชื้อไปยังสิ่งแวดล้อมขณะดำเนินการผลิต ซึ่งระบบป้องกันนั้นมีต้นทุนสูง โดยเฉพาะในการขยายขนาดการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

การผลิตวัคซีนในรูปแบบการใช้เฉพาะโปรตีนองค์ประกอบของไวรัสส่วนที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ดี เช่น Hemagglutinin เป็นการผลิตวัคซีนที่ไม่ต้องมีระบบควบคุมความปลอดภัยของไวรัสขณะดำเนินการผลิต โครงการนี้ได้ทำการผลิต Recombinant hemagglutinin protein จาก Baculovirus Expression Insect Cell System ซึ่งทำโดยการทำพันธุวิศวกรรมแบคทีเรียไวรัส ซึ่งเป็นไวรัสที่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ให้มีเยื่อ hemagglutinin เป็นส่วนหนึ่งของพันธุกรรม และเมื่อนำแบคทีเรียไวรัสไปติดเชื้อเข้าสู่เซลล์แมลง เซลล์แมลงมีการสร้าง recombinant hemagglutinin protein ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยวิธี Western blot analysis โดยใช้ monoclonal antibody ที่มีความจำเพาะกับโปรตีน hemagglutinin ของไวรัส Influenza (H5N1) จากการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตในถังหมัก 2.5 ลิตรพบว่า ควรใช้ไวรัสที่ MOI 0.1 ในการ infect เซลล์แมลงจำนวน  $0.6 \times 10^6$  เซลล์/มล. และทำการเก็บเกี่ยวรีคอมบิแนนต์โปรตีนในวันที่ 5 หลังการ infection ทำการสกัดรีคอมบิแนนต์โปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี ซึ่งสามารถกำจัดโปรตีนปนเปื้อนได้ ปริมาณโปรตีนที่ผลิตได้เท่ากับ 228.5 ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อนำรีคอมบิแนนต์ H5N1 โปรตีนมาทดสอบการสร้างภูมิคุ้มกันในหนูทดลองพบว่าเมื่อฉีดโปรตีนกระตุ้นหนู 3 ครั้งและนำซีรัมของหนูมาตรวจพบว่าการสร้างสารภูมิคุ้มกันต่อรีคอมบิแนนต์ H5N1 โปรตีนในหนูกลุ่มทดลองและไม่พบในกลุ่มควบคุม

**คำสำคัญ:** Influenza (H5N1), Baculovirus expression system and Hemagglutinin protein

## Abstract

Spreading of avian influenza virus (H5N1) and reports on human infection during 2004-2005 caused worldwide concern on influenza pandemic. Vaccine is an alternative method to prevent losses from this disease. To produce this vaccine, viruses must be produced in large amount to be used as antigen to trigger immune system. The viruses are however infectious, therefore virus containment at high biosafety level is required. This certainly affects cost for construction of vaccine factory.

The method is to use recombinant influenza virus protein as antigen. Viral proteins that stimulate immune response such as hemagglutinin could be used. In this study, hemagglutinin protein was produced by Baculovirus Expression Insect Cell System. Baculovirus, which is safe to human and environment, was genetically engineered to have hemagglutinin gene inserted into its genome. The genetically engineered baculoviruses were then infected into their natural insect cell hosts. The recombinant hemagglutinin protein was produced from infected insect cells. The optimal conditions in 2.5 l fermentor to produce the highest level of recombinant protein were obtained. It was found that the baculoviruses at multiplicity of infection (MOI) 0.1 was optimum for infection into  $0.6 \times 10^6$  cells /ml and the protein could be harvested at 5 day post infection. The recombinant hemagglutinin from infected insect cells was purified by using chromatography. The purified hemagglutinin protein production was 228.5  $\mu\text{g}$  /l. The immunogenicity was tested in Balb C mice and found the antibody against H5N1 HA antigen in the serum of these mice.

**Keywords:** Influenza (H5N1), Baculovirus expression system and Hemagglutinin protein

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ	3
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญภาพ	7
บทนำ	9
วัตถุประสงค์	9
ขอบเขตของงานวิจัย	9
ผลงานวิจัย	9
การผลิตรีคอมบีแนนต์ HA โปรตีน	10
การสกัดและทำบริสุทธิ์โปรตีน	16
วิธีการสกัดโปรตีน	18
ผลการทดลองการสกัดโปรตีน	20
การทดสอบรีคอมบีแนนต์ HA โปรตีนในสัตว์ทดลอง	26
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	35
เอกสารอ้างอิง	37
ภาคผนวก	39

## สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	ความเข้มข้นเซลล์ และค่า MOI ที่ใช้ในการทดลองนี้	หน้า 12
------------	---	------------

## สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	ปริมาณเซลล์มีชีวิต (viable cell) หลังการ infect ที่ MOI 0.1 1.0 และ 5.0	10
รูปที่ 2	ปริมาณ recombinant HA protein ผลิตจากเซลล์แมลงจากการใช้เซลล์ เริ่มต้นที่ $1 \times 10^6$ cells/ml และปริมาณไวรัส MOI 0.1, 1.0 และ 5.0 A) Western blot analysis B) กราฟแท่งสร้างจากการวัดความเข้มข้นของแถบ โปรตีนบน Western blot analysis ลูกศรแสดงวันที่ควรเก็บโปรตีน	11
รูปที่ 3	ความเข้มข้นของเซลล์ที่มีชีวิตต่อเวลาหลังการ infect ที่ความเข้มข้นเซลล์และ MOI ต่างๆ	12
รูปที่ 4	Intensity ของ recombinant HA protein ที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับกัน ตั้งแต่ วันที่ 3 ถึง 5 หลังการ infect	13
รูปที่ 5	ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตต่อเวลาของเซลล์ Sf-9 ที่เลี้ยงในขวดทดลองและถังหมัก	14
รูปที่ 6	การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์หลังการ infect ที่ความเข้มข้นเซลล์ $6 \times 10^5$ เซลล์ต่อมล. Infect เซลล์ที่ ค่า MOI 0.1 ในขวดทดลองและถังหมัก 2.5 ลิตร	15
รูปที่ 7	แถบ recombinant HA protein ที่ได้จาก Western Blot analysis โดย เปรียบเทียบการผลิตในขวดทดลองและในถังหมัก เก็บตัวอย่างวันที่ 3-5 หลัง การ infect	15
รูปที่ 8	Intensity ของ recombinant HA protein ที่ได้จาก Western Blot analysis โดยเปรียบเทียบการผลิตในขวดทดลองและในถังหมัก เก็บตัวอย่าง วันที่ 3-5 หลังการ infect	15
รูปที่ 9	การตรวจสอบโปรตีนด้วย 10%SDS/PAGE และย้อมสี Silver staining แสดงผลการผ่านสารสกัดโปรตีน rHA จากเซลล์ลงในคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ ลบ QXL ตามด้วย QFF (QXL/QFF)	20
รูปที่ 10	การตรวจสอบโปรตีนด้วย 10%SDS/PAGE และย้อมสี Silver staining แสดงผลโปรตีนหลังการผ่าน QXL/QFF และนำส่วน flow through ลง คอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุบวก SP-Sepharose	21
รูปที่ 11	การตรวจสอบโปรตีนด้วย 10%SDS/PAGE และย้อมสี Silver staining แสดงผลโปรตีนหลังการผ่าน QXL/QFF, SP-Sepharose (ที่ชะด้วย 14-18% บีฟเฟอร์ B) และ ceramic hydroxyapatite type I (CHT)	22
รูปที่ 12	การตรวจสอบโปรตีนด้วย 10%SDS/PAGE และย้อมสี Coomassie Blue staining แสดงผลโปรตีนหลังการผ่าน CHT คอลัมน์ และเพิ่มความเข้มข้น ด้วย centrifugal concentrator ที่ molecular weight cut off 50 kDa	24
รูปที่ 13	Western blot analysis แสดงตัวอย่างโปรตีนก่อนและหลังการแยกด้วยโคร มาโตกราฟี แถบโปรตีนแสดงความจำเพาะกับแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน HA	25

		หน้า
รูปที่ 14	การตรวจสอบตัวอย่างโปรตีนด้วย Hemagglutination assay ใช้ 0.5% goose red blood cell	25
รูปที่ 15a	การทดสอบซีรัมเพื่อตรวจหา Nonspecific Agglutinins ตัวอย่างหมายเลข 1-8 คือ ซีรัมที่ผ่านการ treat แล้วของหนูทดลอง 8 ตัวหลังการ immunization ตัวอย่างหมายเลข 9 คือ monoclonal antibody ต่อ H5N1HA antigen ที่การเจือจาง 1: 2,000 ซึ่งจะใช้เป็น positive control ในการทดสอบ HAI ส่วน PBS คือ หลุมควบคุม	29
รูปที่ 15b	การทดสอบซีรัมเช่นเดียวกับรูปที่ 1a เมื่อเอียงเพลทแล้วพบว่าเกิดการไหลของ เม็ดเลือดแดง	29
รูปที่ 15c	การทดสอบซีรัมเพื่อตรวจหา Nonspecific Agglutinins ตัวอย่างหมายเลข 1-8 คือ ซีรัมที่ผ่านการ treat แล้วของหนูทดลอง 8 ตัวหลังการ immunization ตัวอย่างหมายเลข 9 คือ monoclonal antibody ต่อ H5N1HA antigen ที่การเจือจาง 1: 2,000 ซึ่งจะใช้เป็น positive control ในการทดสอบ HAI ส่วน PBS คือ หลุมควบคุม	30
รูปที่ 15d	การทดสอบซีรัมเช่นเดียวกับรูปที่ 1c เมื่อเอียงเพลทแล้วพบว่าเกิดการไหลของ เม็ดเลือดแดง	30
รูปที่ 16	HA antigen ในปริมาตร 50 $\mu$ l ที่การเจือจาง 1 : 32 มีค่า HA titer เท่ากับ 1 Hemagglutinating unit (HAU) ดังนั้น HA antigen ที่ไม่ได้เจือจางจึงมีค่า HA titer เท่ากับ 32 HAU/50 $\mu$ l	31
รูปที่ 17	การทำ black titration เพื่อยืนยันความเข้มข้น 8 HAU/ 50 $\mu$ l ของ HA antigen	32
รูปที่ 18a	การทดสอบ HAI ตัวอย่างหมายเลข 1 ถึง 8 คือซีรัมของหนู 8 ตัวก่อนการ immunization และหลุมควบคุมซึ่งใช้สารละลาย PBS แทนแอนติเจนและ แอนติบอดี	32
รูปที่ 18b	การทดสอบ HAI ตัวอย่างหมายเลข 1 ถึง 8 คือซีรัมของหนู 8 ตัวที่ผ่านการ immunization แล้ว สำหรับหลุมควบคุม+ ve คือ monoclonal antibody ต่อ H5N1 HA antigen เริ่มที่การเจือจาง 1: 2,000 และหลุมควบคุมซึ่งใช้ สารละลาย PBS แทนแอนติเจนและแอนติบอดี	33
รูปที่ 19	ผลการทำ dot blot หมายเลข 1-8 คือใช้ซีรัมจากหนูทดลอง 8 ตัวก่อนและ หลัง immunization เป็น primary antibody	35

## บทนำ

การระบาดของไวรัส Influenza (H5N1) ในสัตว์ปีก และรายงานการติดเชื้อสายพันธุ์นี้จากสัตว์ปีกไปสู่คนในช่วงระหว่างปี ค.ศ. 2004-2005 ก่อให้เกิดความกังวลไปทั่วโลกว่าไวรัสสายพันธุ์นี้อาจเกิดกลายพันธุ์จนสามารถแพร่เชื้อระหว่างมนุษย์ และเกิดการระบาดไปทั่วโลกได้ (pandemic) การใช้วัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อกรณีมีการระบาดเกิดขึ้น ถือเป็นวิธีการหนึ่งซึ่งจะช่วยลดความสูญเสียต่อชีวิตและทรัพย์สินของประชากรโลกได้

องค์การอนามัยโลก (WHO) ได้พยายามสนับสนุนและส่งเสริมให้ทั้งภาครัฐและเอกชนในประเทศต่างๆ เพิ่มศักยภาพในการผลิตวัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัส H5N1 สำหรับมนุษย์ เพื่อให้แน่ใจว่าหากมีการระบาดเกิดขึ้นจะมีวัคซีนเพียงพอที่จะใช้ทั้งในประเทศผู้ผลิต รวมถึงประเทศกำลังพัฒนาอื่นๆ ที่สามารถซื้อวัคซีนในราคาที่เหมาะสมได้ โดยปัจจุบันหลายประเทศทั้งแถบอเมริกาเหนือและประเทศในแถบยุโรป ได้เริ่มเตรียมการผลิตวัคซีน H5N1 และทำการทดสอบประสิทธิภาพเพื่อที่จะนำมาใช้ อย่างไรก็ตาม องค์การอนามัยโลกประเมินว่าหากมีการระบาดของไวรัส H5N1 นี้ไปทั่วโลกจริง วัคซีนเหล่านี้จะมีไม่เพียงพอที่จะไปถึงประชากรประเทศกำลังพัฒนาทั้งหลาย โดยเฉพาะในช่วงแรกของการระบาด ดังนั้นประเทศกำลังพัฒนาทั้งหลาย รวมทั้งประเทศไทยมีความจำเป็นต้องมีการเตรียมความพร้อมทางด้านเทคโนโลยีและกระบวนการผลิตวัคซีนชนิดนี้ โครงการเป็นโครงการต่อเนื่อง หลังจากที่ได้มีการผลิต recombinant hemagglutinin protein ของไวรัสอินฟลูเอนซาสายพันธุ์ H5N1 จากเซลล์แมลงโดยระบบ Baculovirus Expression Insect Cell System ในโครงการที่ 1 แล้วคณะผู้ประเมินเห็นว่าควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในด้านคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนสำหรับใช้เป็นวัคซีน (immunogenicity) หรือใช้เป็นโปรตีนมาตรฐานในชุดตรวจวินิจฉัย และด้านการขยายขนาดการผลิตในระบบถังหมักขนาด 2.5 ลิตร เพื่อเป็นข้อมูลในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป คณะผู้วิจัยจึงเสนอโครงการนี้เป็นโครงการต่อเนื่องจากโครงการแรก

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของ recombinant hemagglutinin (HA) protein ของไวรัสอินฟลูเอนซาสายพันธุ์ H5N1 ทั้งทางด้านชีวเคมีและคุณสมบัติทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunogenicity)
2. เพื่อขยายขนาดการผลิต recombinant hemagglutinin (HA) protein ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร

### ขอบเขตของการวิจัย

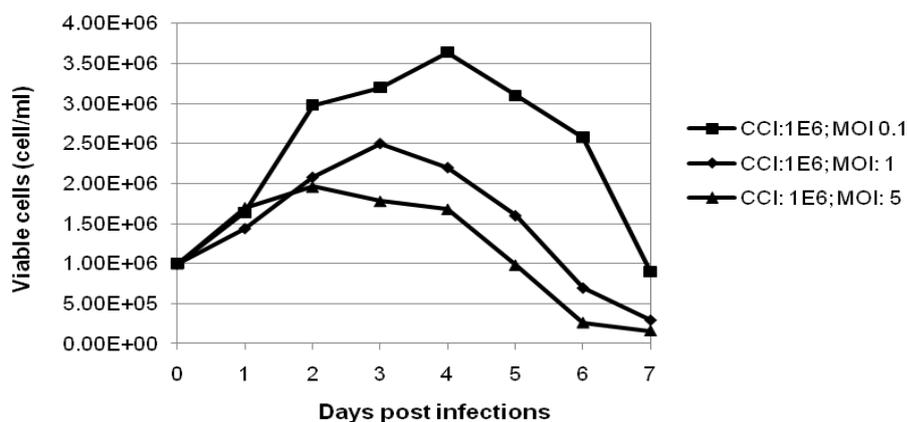
1. การสกัด recombinant HA protein ให้บริสุทธิ์ (ต่อเนื่องจากโครงการระยะที่ 1) เพื่อนำโปรตีนบริสุทธิ์ไปศึกษาต่อในขั้นตอนต่อไป
2. ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี และคุณสมบัติทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunogenicity) ของโปรตีนเพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้เป็นวัคซีน หรือใช้เป็นโปรตีนมาตรฐานในชุดตรวจวินิจฉัย
3. ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต recombinant HA protein จากเซลล์แมลงในถังหมักระดับ 2.5 ลิตร

## รายละเอียดผลงานของโครงการวิจัย ผลการวิจัย

### 1. การผลิตรีคอมบิแนนต์ HA โปรตีน (recombinant HA protein)

#### 1.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต recombinant HA protein ในขวดทดลอง

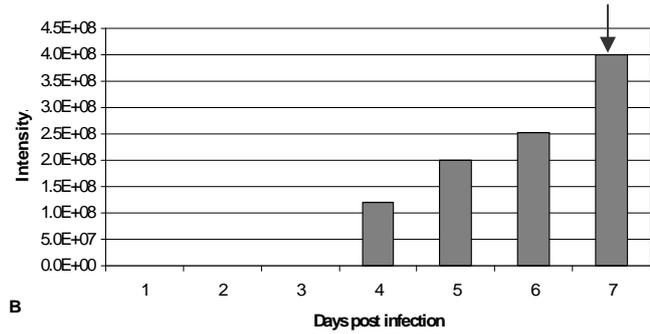
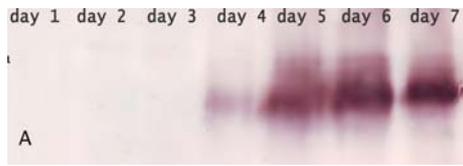
การผลิต recombinant HA protein ในเซลล์แมลง Sf-9 การผลิตโปรตีนในเบื้องต้นจะทำในขวดทดลอง (shake flask) ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต recombinant HA protein โดยเซลล์แมลงมีหลายปัจจัยที่สำคัญเช่น ปริมาณเซลล์ตั้งต้น และปริมาณไวรัสที่เหมาะสม (Multiplicity of infection, MOI) ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ เป็นต้น ในงานวิจัยนี้ศึกษาว่า Multiplicity of infection (MOI) ที่ใช้ในการ infect และเวลาในการเก็บเกี่ยวโปรตีนหลังจากการ infect โดยทำการทดลองในขวดทดลองปริมาตรการเลี้ยง 25 มล. ทำการ infect cell ที่ความเข้มข้นเซลล์  $1 \times 10^6$  cells/ml ปริมาณไวรัสที่ทดสอบ คือ MOI เท่ากับ 0.1, 1.0 และ 5.0 ภายหลังจากการ infect ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์มา นับปริมาณทุกวันเป็นเวลา 7 วันและตรวจวัดวัดปริมาณ recombinant HA protein ด้วยวิธี Western blot analysis ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 1 และ 2 โดยรูปที่ 1 แสดงความเข้มข้นเซลล์กับเวลาหลัง infection วันที่ 1 ถึง 7 ที่ MOI 0.1 1.0 และ 5.0



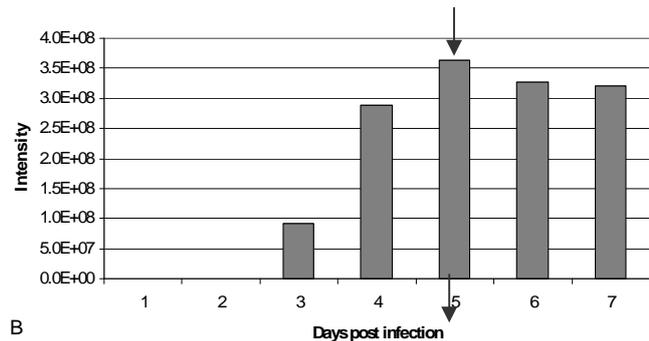
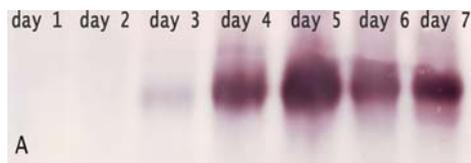
รูปที่ 1 ปริมาณเซลล์มีชีวิต (viable cell) หลังการ infect ที่ MOI 0.1 1.0 และ 5.0

จากรูปที่ 1 เมื่อตรวจวัดจำนวนเซลล์แมลงภายหลังการ infect พบว่าเซลล์ยังคงเพิ่มจำนวนได้ในทุกการทดลองที่ใช้ไวรัสปริมาณต่างๆ โดยการทดลองที่มีเซลล์ยังคงเจริญเพิ่มมากที่สุด คือ เมื่อใช้ไวรัส MOI 0.1 เนื่องจากมีปริมาณไวรัสต่อจำนวนเซลล์น้อยที่สุด ยังคงมีเซลล์บางส่วนที่ไม่ถูกไวรัสในรอบแรก (primary infection) จึงยังคงเพิ่มจำนวนได้ ส่วนอีก 2 ตัวอย่างที่มีการเพิ่มจำนวนไวรัสต่อเซลล์ (MOI 1 และ 5) จะพบเซลล์ที่รอดจากการ infect ของไวรัสรอบแรกน้อยกว่า จำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตและเพิ่มจำนวนได้จึงมีน้อยกว่า และเมื่อเปรียบเทียบระดับการผลิต recombinant HA protein จากตัวอย่างที่เก็บทุกวันมาตรวจสอบด้วย Western blot analysis จากนั้นสร้างกราฟเปรียบเทียบความเข้มของแถบโปรตีนที่จำเพาะต่อ monoclonal antibody ที่แปรผันตรงกับปริมาณโปรตีนที่ผลิตได้ ดังแสดงในรูปที่ 2

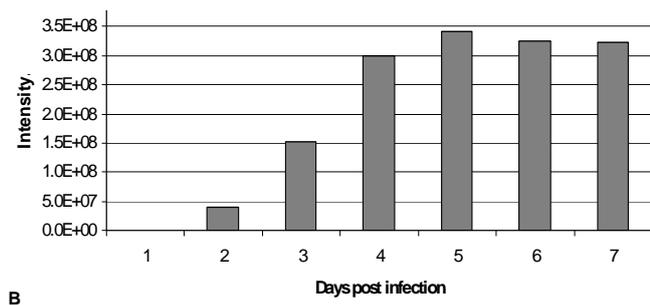
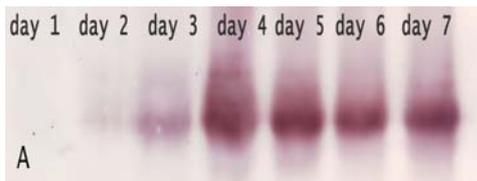
### MOI 0.1



### MOI 1



### MOI 5



รูปที่ 2 ปริมาณ recombinant HA protein ผลิตจากเซลล์แมลงจากการใช้เซลล์เริ่มต้นที่  $1 \times 10^6$  cells/ml และปริมาณไวรัส MOI 0.1, 1.0 และ 5.0 A) Western blot analysis B) กราฟแท่งสร้างจากการวัดความเข้มของแถบโปรตีนบน Western blot analysis ลูกศรแสดงวันที่ควรเก็บโปรตีน

จากรูปที่ 2 พบว่าภายหลังจาก infect จะมีปริมาณ recombinant HA protein เพิ่มมากขึ้นในทุกตัวอย่างเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น แต่โปรตีนที่เริ่มวัดได้และที่มีปริมาณสูงสุดพบได้ในเวลาที่แตกต่างกัน โดยเมื่อใช้ MOI 0.1 เริ่มตรวจวัดโปรตีนได้ในวันที่ 4 และเพิ่มปริมาณมากขึ้นในทุกวันจนมีปริมาณสูงที่สุดในวันที่ 7 หลังการ infect สำหรับการ infect ที่ MOI 1.0 และ MOI 5.0 พบว่าสามารถตรวจวัดโปรตีนในวันที่เร็วขึ้นคือวันที่ 3 และ 2 ตามลำดับและพบว่าปริมาณสูงสุดของโปรตีนที่ตรวจพบเป็นวันที่ 5 หลังการ infect จากการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ผลิตจากการใช้ไวรัสที่ MOI ต่างๆ พบว่าปริมาณโปรตีนสูงสุดที่ผลิตได้คือที่ MOI 0.1 เมื่อเก็บเกี่ยวโปรตีนในวันที่ 7 สำหรับการ infect MOI 1.0 และ 5.0 พบว่าในวันที่ 5 มีการผลิตโปรตีนนี้ได้สูงสุด ความเข้มของโปรตีนที่วัดได้ต่ำกว่าปริมาณโปรตีนที่ผลิตได้จากการ infect MOI 0.1 แต่ไม่มากนักเมื่อพิจารณาจำนวนวันที่เลี้ยงจนถึงเก็บเกี่ยวพบว่าที่ MOI ที่ 1.0 และ 5.0 สามารถเก็บเกี่ยวโปรตีนได้ในวันที่ 5 หลังการ infect

ในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต recombinant HA protein ต่อไปได้เปลี่ยนค่าความเข้มข้นของเซลล์ที่ infection เป็น  $2 \times 10^6$  cells/ml และ  $0.6 \times 10^6$  cells/ml โดยใช้การทดลองที่ผ่านมาคือที่ความเข้มข้นเซลล์ตั้งต้น  $1 \times 10^6$  cells/ml ทำการ infect ค่า MOI เท่ากับ 0.1 และ 1.0 เป็นตัวเปรียบเทียบการผลิต recombinant HA protein

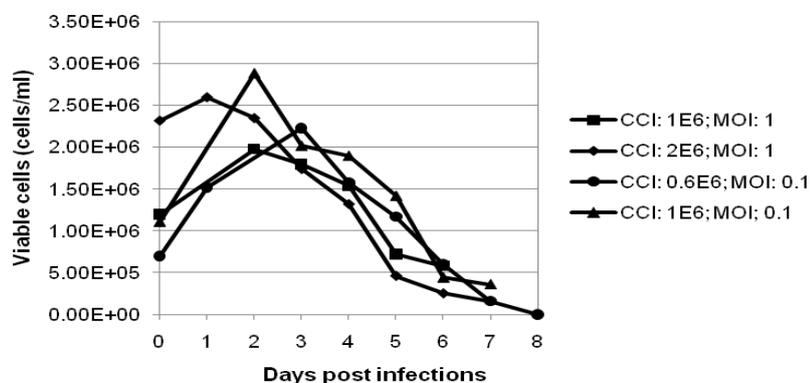
## 1.2 เปรียบเทียบค่า ความเข้มข้นเซลล์ตั้งต้นที่ $2 \times 10^6$ cells/ml $1 \times 10^6$ cells/ml และ $0.6 \times 10^6$ cells/ml ในการผลิต recombinant HA protein

จากผลการทดลองที่ผ่านมาข้างต้นทำการทดลอง infect เซลล์ที่ความเข้มข้นเซลล์  $1 \times 10^6$  เซลล์ต่อมล.และผลการทดลองที่ ค่า MOI 0.1 และ 1.0 ให้ผลปริมาณโปรตีนสูงซึ่งจะใช้เป็นการทดลองเปรียบเทียบ (control) ในการทดลองนี้และแปรเปลี่ยนค่าความเข้มข้นของเซลล์ให้สูงขึ้น เป็น  $2 \times 10^6$  และให้ต่ำลงเป็น  $0.6 \times 10^6$  cells/ml โดยแผนการทดลองแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นเซลล์ และค่า MOI ที่ใช้ในการทดลองนี้

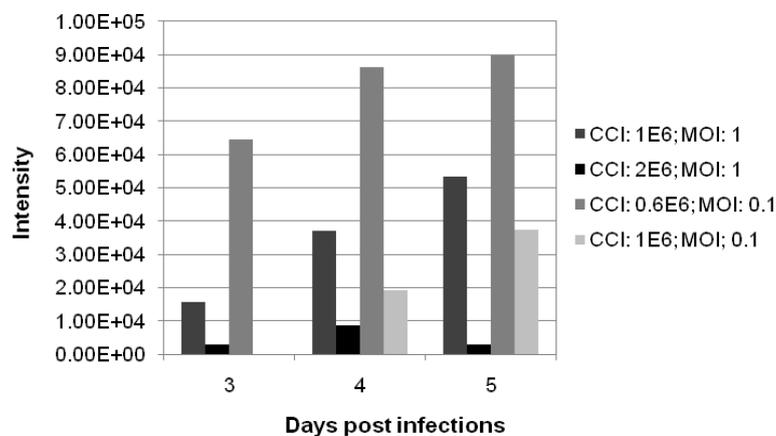
ตัวอย่าง	ความเข้มข้นเซลล์ที่ infection (cells/ml)	MOI
1	$1 \times 10^6$	1
2	$2 \times 10^6$	1
3	$6 \times 10^5$	0.1
4	$1 \times 10^6$	0.1

ในการทดลองเลี้ยงเซลล์โดยใช้เซลล์เริ่มต้น (inoculum) ที่  $3 \times 10^5$  cells/ml แล้วทำการ infect ด้วยไวรัสเมื่อเซลล์มีความเข้มข้นตามแผนการทดลองในตารางที่ 1 ที่ค่า MOI ต่างๆ ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ทุกวันหลังการ infect นำตัวอย่างมานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ได้ผลการทดลองดังแสดงใน รูปที่ 3



รูปที่ 3 ความเข้มข้นของเซลล์ที่มีชีวิตต่อเวลาหลังการ infect ที่ความเข้มข้นเซลล์และ MOI ต่างๆ

จากกราฟรูปที่ 3 จะเห็นว่าในทุกการทดลองเซลล์จะมีปริมาณสูงขึ้นในวันแรกหลังการ infection และจะมีปริมาณลดลงในวันที่ 2 สำหรับการทดลองที่มีการ infect cell ที่ความเข้มข้นเซลล์ที่  $2 \times 10^6$  cells/ml สำหรับการทดลองที่มีการ infect cell ที่ความเข้มข้นเซลล์ต่ำกว่านั้น เซลล์จะยังคงเพิ่มปริมาณไปอีก 1 ถึง 2 วัน ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตจึงเริ่มลดลง ทั้งนี้เป็นเพราะปริมาณเซลล์มีมากกว่าปริมาณไวรัสทำให้เกิดการ infect ได้ มากกว่า 1 รอบ เรียกว่าเกิด secondary infection นั่นเอง เมื่อนำเซลล์ที่ได้มาสกัดเพื่อหาปริมาณ recombinant HA protein และตรวจปริมาณโดยวิธี Western Blot analysis เปรียบเทียบกันในแต่ละการทดลอง โดยวัดค่าความเข้มด้วยเครื่องวิเคราะห์ความเข้มของแถบโปรตีน (densitometer) แล้วนำมาแสดงในแบบแผนภูมิแท่งในรูปที่ 4 ของทุกการทดลองโดยเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างหลังการ infect ในวันที่ 3 ถึงวันที่ 5 แสดงดังกราฟรูปที่ 4

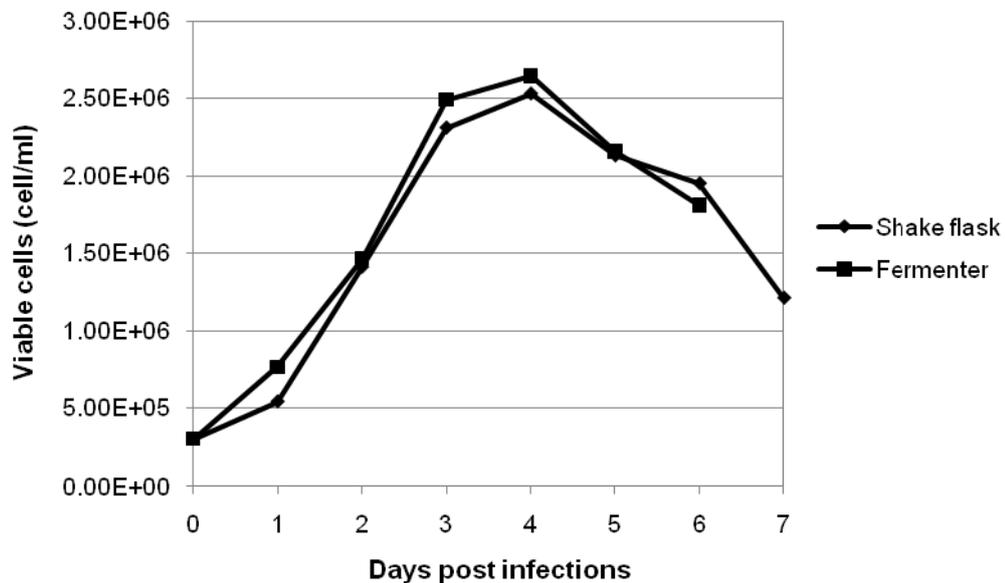


รูปที่ 4 Intensity ของ recombinant HA protein ที่ผลิตได้เปรียบเทียบกัน ตั้งแต่วันที่ 3 ถึง 5 หลังการ infect

จากรูปพบว่าในสภาวะการทดลองที่ใช้ ความเข้มข้นเซลล์ที่  $0.6 \times 10^6$  cells/ml และ ค่า MOI 0.1 มีการตรวจพบปริมาณ recombinant HA protein สูงที่สุดโดยปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นระหว่างวันที่ 3 ถึงวันที่ 5 ซึ่งมีค่าสูงกว่าสภาวะควบคุมทั้งสองสภาวะคือที่ความเข้มข้นเซลล์ที่  $1 \times 10^6$  cells/ml ค่า MOI 0.1 และ ที่ความเข้มข้นเซลล์ที่  $1 \times 10^6$  cells/ml ค่า MOI 1.0 ส่วนสภาวะการทดลองที่ให้ผลผลิตปริมาณโปรตีนต่ำที่สุดคือ ที่ความเข้มข้นเซลล์ที่  $2 \times 10^6$  cells/ml ค่า MOI 1.0

ดังนั้นในการขยายขนาดการทดลองในถังหมัก 2.5 ลิตร จึงเลือกสภาวะในการผลิตรีคอมบิแนนท์ HA โปรตีนที่ ความเข้มข้นเซลล์ที่  $0.6 \times 10^6$  cells/ml ทำการ infect ที่ค่า MOI 0.1 ปริมาตรในการผลิต (working volume) คือ 1 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 27 องศาเซลเซียส กวนที่ 100 รอบต่อ นาที ใช้ความเข้มข้นเซลล์ตั้งต้น (inoculum) ที่  $3 \times 10^5$  cells/ml หลัง เก็บตัวอย่างทุกวันหลังการ เพื่อดูปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและวัดปริมาณ recombinant HA protein โดยวิธี Western Blot analysis

ในเบื้องต้นทำการเลี้ยงเซลล์เพื่อดูรูปแบบการเจริญของเซลล์แมลง Sf-9 ในถังหมักเปรียบเทียบกับ การเจริญเติบโตของเซลล์ที่เลี้ยงในขวดทดลอง โดยเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเทียบกับเวลาที่เลี้ยง ทำการเก็บตัวอย่างทุกวัน มาตรวจวัดจำนวนเซลล์โดยใช้ trypan blue ย้อมเซลล์ เซลล์ที่ตายจะติดสีฟ้าของสีย้อม ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 5

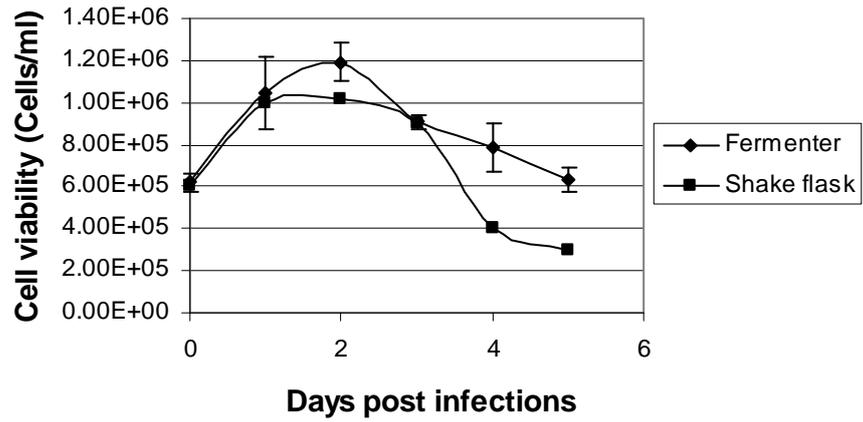


รูปที่ 5 ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตต่อเวลาของเซลล์ Sf-9 ที่เลี้ยงในขวดทดลองและถังหมัก

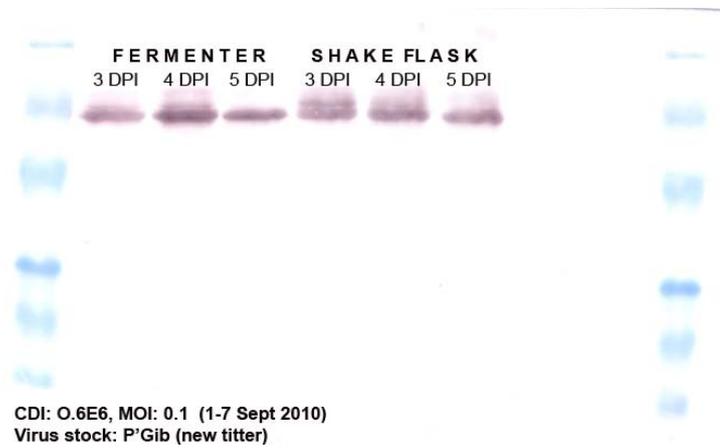
จากผลการทดลองพบว่ารูปแบบการเจริญ ของเซลล์ Sf-9 ที่เลี้ยงในขวดทดลองและถังหมัก คล้ายกันมากปริมาณเซลล์ที่วันต่างๆมีค่าใกล้เคียงกัน แสดงว่าสภาวะที่ใช้ในถังหมักและขวดทดลองมีค่าใกล้เคียงกันเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ Sf-9

### 1.3 การขยายขนาดการผลิต recombinant HA protein ในถังหมัก 2.5 ลิตร

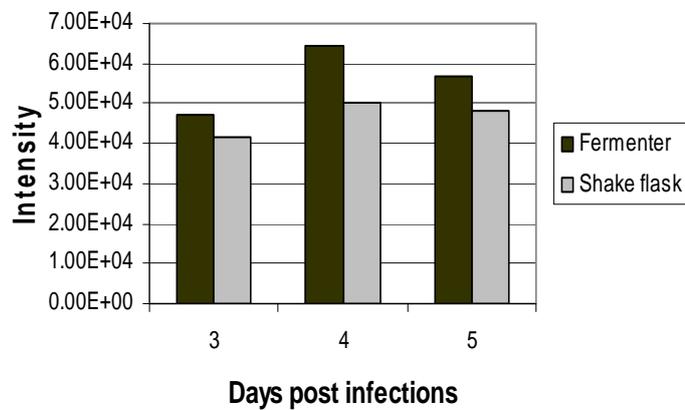
จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต recombinant HA protein ในขวดทดลองในหัวข้อ 2.1 พบว่าสภาวะที่ดีที่สุดในการผลิต recombinant HA protein คือที่ความเข้มข้นเซลล์  $6 \times 10^5$  เซลล์ต่อมล. Infect เซลล์ที่ ค่า MOI 0.1 ในการทดลองนี้จึงทำการขยายขนาดการผลิต recombinant HA protein ในถังหมัก 2.5 ลิตรด้วยสภาวะเดียวกันนี้โดยเปรียบเทียบกับการผลิตในขวดทดลองและทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อหาปริมาณเซลล์และ recombinant HA protein โดยหาปริมาณ recombinant HA protein ที่ได้จากการทดลองด้วยวิธี Western Blot analysis และวัดความเข้มข้นของแถบโปรตีนแสดงผลในรูปของกราฟแท่งโดยผลการทดลองแสดงในรูปที่ 6-8



รูปที่ 6 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์หลังการ infect ที่ความเข้มข้นเซลล์  $6 \times 10^5$  เซลล์ต่อมล. Infect เซลล์ที่ ค่า MOI 0.1 ในขวดทดลองและถังหมัก 2.5 ลิตร



รูปที่ 7 แถบ recombinant HA protein ที่ได้จาก Western Blot analysis โดยเปรียบเทียบการผลิตในขวดทดลองและในถังหมัก เก็บตัวอย่างวันที่ 3-5 หลังการ infect



รูปที่ 8 Intensity ของ recombinant HA protein ที่ได้จาก Western Blot analysis โดยเปรียบเทียบการผลิตในขวดทดลองและในถังหมัก เก็บตัวอย่างวันที่ 3-5 หลังการ infect

ผลการทดลองพบว่าการเลี้ยงทั้งสองแบบ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต จะเริ่มลดลงหลังจากวันที่ 2 ของการ infect โดยการเลี้ยงในถังหมักจะทำให้ได้จำนวนเซลล์สูงกว่าการเลี้ยงในขวดเขย่าเล็กน้อย แต่อัตราการตายของเซลล์หลังจากวันที่ 2 ก็สูงกว่าเช่นกันดังแสดงในกราฟรูปที่ 6 เมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีนที่ได้จากการเลี้ยงในถังหมักจะมีค่าสูงกว่าปริมาณโปรตีนที่ได้จากการเลี้ยงในขวดเขย่าดังแสดงในกราฟรูปที่ 8 โดยมีค่าสูงสุดที่วันที่ 4 ของการ infect ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในกรณีที่เลี้ยงในถังหมักเราสามารถให้อากาศได้ตลอดเวลาจากท่อก๊าซในขณะที่ขวดทดลองไม่สามารถทำได้ ปริมาณโปรตีนจากการเลี้ยงทั้ง 2 แบบในวันที่ 4 และ 5 จะสูงกว่าวันที่ 3 มาก โดยวันที่ 4 จะสูงกว่าวันที่ 5 ทั้งสองกรณี แม้ว่า กรณีเลี้ยงในขวดเขย่า จะสูงกว่ากันเพียงเล็กน้อย สรุปว่าวันที่ 4 เป็นวันที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยว recombinant HA protein ในการผลิตทั้งในขวดทดลองและถังหมักที่สภาวะการผลิตโดยทำการ infect เซลล์ที่ความเข้มข้น  $6 \times 10^5$  เซลล์ต่อมล. Infect เซลล์ที่ ค่า MOI 0.1

## 2. การสกัดและทำบริสุทธิ์โปรตีน

วัสดุ-อุปกรณ์-สารเคมี

บัฟเฟอร์และคอลัมน์

คอลัมน์

Hitrap Q XL column (GE Healthcare/Pharmacia, Piscataway) 1 ml

Hitrap Q FF column (GE Healthcare/Pharmacia, Piscataway) 1 ml

SP- Sepharose column (GE Healthcare/Pharmacia Biotech, Piscataway)  $\phi$  1.5 cm  
x 8 cm, 7 ml

Ceramic Hydroxyapatite type I column (CHT type I, Bio-Rad, Hercules) 5 ml

บัฟเฟอร์

บัฟเฟอร์ A pH 5.89

20 mM sodium phosphate

1.0 mM EDTA

0.01 % Tergitol-NP9

5% glycerol

Extraction buffer pH 5.9

1 % Tergitol NP-9 ใน บัฟเฟอร์ A

บัฟเฟอร์ B pH 7.5

20 mM sodium phosphate

0.03 % Tergitol-NP9

5% glycerol

บัฟเฟอร์ C pH 7.5

20 mM sodium phosphate

150 mM NaCl

0.03 % Tergitol-NP9

5% glycerol

บัฟเฟอร์ D pH 6.0

20 mM sodium phosphate

0.03 % Tergitol-NP9

5% glycerol

บัฟเฟอร์ E pH 7.20

40 mM sodium phosphate

0.05 % Tween-20

5% glycerol

บัฟเฟอร์ F pH 7.20

100 mM sodium phosphate

0.05 % Tween-20

5% glycerol

บัฟเฟอร์ G pH 7.20

500 mM sodium phosphate

0.05 % Tween-20

5% glycerol

## วิธีการสกัดโปรตีน

### 2.1 การผลิต recombinant HA protein เพื่อใช้ในการสกัดรีคอมบิแนนต์ HAโปรตีน

เลือกสภาวะในการผลิตรีคอมบิแนนต์ HA โปรตีนตามที่ทดลองมาแล้วว่าได้ปริมาณโปรตีนสูงที่สุดคือที่ ใช้ความเข้มข้นเซลล์แมลง Sf9 เริ่มต้นที่  $0.6 \times 10^6$  cells/ml ทำการ infect ด้วย recombinant baculovirus ที่ MOI 0.1 ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ปริมาตรในการผลิต คือ 1 ลิตร ความคุมอุณหภูมิที่ 27 องศาเซลเซียส กวนที่ 100 รอบต่อนาที นำเซลล์ที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 rpm นาน 10 นาที เพื่อแยกเก็บเซลล์ และล้างด้วย phosphate buffer saline pH 7.2-7.4 โดยปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ 4,500 rpm นาน 5 นาที จำนวน 2-3 รอบ เพื่อล้างทำความสะอาดตะกอนเซลล์

### 2.2 การสกัด recombinant HA protein

นำเซลล์แมลง ที่ได้จากการผลิต recombinant HA protein ในถังหมักน้ำหนักเปียก ประมาณ 2.42 กรัม และเซลล์มาใส่ที่ได้จากขวดแบบเขย่าน้ำหนักเปียกประมาณ 1.78 กรัม รวมน้ำหนักเปียกทั้งหมดเท่ากับ 4.20 กรัม เติม extraction buffer (1 % Tergitol NP-9 ใน บัฟเฟอร์ A pH 5.9) ปริมาตร 147.50 ml ลงไปผสมด้วย magnetic stirrer นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  แล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 g นาน 25 นาที และกรองตะกอนเซลล์ที่เหลืออยู่ผ่านแผ่นกรองขนาดรูพรุน  $0.45 \mu\text{m}$  ก่อนแล้วจึงนำเฉพาะส่วนใสมาสกัดแยกโปรตีน

### 2.3 การแยกและทำบริสุทธิ์ recombinant protein

1. นำสารละลายใสของโปรตีนใน extraction buffer ปริมาตร 145 ml มาผ่านลงในคอลัมน์ แลกเปลี่ยนประจุ QXL ต่อกับ QFF (GE healthcare) ขนาด 1 ml ซึ่งทำให้เรซินภายในอิมิตัวด้วย บัฟเฟอร์ A pH 5.9 แล้ว ด้วยอัตราการไหล 2 ml/min เก็บส่วนที่ผ่านคอลัมน์ (QXL/QFF flow through) ออกมาเพื่อนำไปแยกโปรตีนต่อ และเก็บบางส่วนเพื่อไปวิเคราะห์ ด้วย 10% SDS/PAGE ย้อมแผ่นเจลที่ได้ด้วย silver staining ส่วนคอลัมน์นำไปล้างด้วยบัฟเฟอร์ A ตามด้วย 1M NaCl และ 1 M NaOH ตามลำดับ สุดท้ายล้างด้วยน้ำ ปราศจากประจุ (Deionized water) และเก็บคอลัมน์ใน 20% ethanol

2. นำ fraction ส่วน QXL/QFF flow through จากคอลัมน์ QXL/QFF (เรียก SP-Sepharose sample) ไปผ่านคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุบวก SP-Sepharose (GE healthcare) ซึ่งทำให้เรซินภายในอิมิตัวก่อนหน้าด้วยบัฟเฟอร์ A pH 5.89 อยู่ก่อนแล้ว โดย pack คอลัมน์ขนาด 8 ml ผ่าน sample เข้าสู่คอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 2 ml/min เก็บ fraction ส่วนที่ไหลผ่านคอลัมน์ (SP-Sepharose flow through) ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ A อย่างน้อย 5 column volume เก็บ fraction ส่วนที่ล้างคอลัมน์ (SP-Sepharose wash) แล้วชะโปรตีนที่เกาะคอลัมน์แบบ linear gradient จาก 0% ถึง 100% ด้วยบัฟเฟอร์ B pH 7.5 และบัฟเฟอร์ C ซึ่งมี pH 7.5 และ 150 mM NaCl ระหว่างนี้เก็บ fraction ส่วนที่ชะโปรตีนเป็นช่วงๆ (SP-Sepharose Elute) จาก 0%B จนถึง 100 B% และจาก 100%B จนถึง 100 %C) นำ fraction ส่วนต่างที่ได้ไปวิเคราะห์ ด้วย 10%SDS PAGE ย้อมแผ่นเจลที่ได้ด้วย silver staining

ส่วนคอลัมน์ที่ใช้แล้ว นำมาล้างโปรตีนที่เหลือเกาะคอลัมน์ออกด้วย 1 M NaCl และ 1 M NaOH เก็บคอลัมน์ใน 0.2 M sodium acetate ใน 20% ethanol

3. นำ Fraction SP-Sepharose (Elute 14-18%B) ซึ่งคือ ส่วนที่ชะด้วยบัฟเฟอร์ B 14-18% จากคอลัมน์ SP-Sepharose หรือ Fraction SPFF Elute 18-25%B หรือ 25%B ปริมาตร 8 ml ซึ่งตรวจสอบด้วย 10%SDS/PAGE แล้วว่ามี recombinant HA protein (rHA) อยู่ ไปแยกต่อโดยนำไปผ่านคอลัมน์ ceramic hydroxyapatite CHT<sup>TM</sup> type1 จากบริษัท Biorad ขนาด 5 ml ซึ่งผ่านการทำให้ เรซินภายในอิมมัตด้วยบัฟเฟอร์ B pH 6.00 แล้วนำโปรตีนตัวอย่างที่เลือก (CHT sample) ผ่านลงสู่คอลัมน์ที่อัตราการไหล 2 ml/min เก็บ fraction ส่วนที่ผ่านคอลัมน์ (CHT flow through) ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ B อย่างน้อย 5 column volume เก็บ fraction ส่วนที่ล้างคอลัมน์ (CHT wash) และชะ (elute) โปรตีนที่เกาะคอลัมน์อยู่ด้วยบัฟเฟอร์ D (40 mM phosphate pH 7.20) ตามด้วยบัฟเฟอร์ E (100 mM phosphate pH 7.20) และ บัฟเฟอร์ F (500 mM phosphate pH 7.20) ตามลำดับ ระหว่างนี้เก็บ fraction ส่วนที่ชะโปรตีนเป็นช่วงๆ (CHT Elute) นำ elute fraction จากบัฟเฟอร์ D 40 mM phosphate pH 7.20 ไปทำให้เข้มข้นด้วย Amicon<sup>TM</sup> Ultra 15 centrifugal concentrator ที่มี molecular weight cut off 30 kDa โดยปั่นเหวี่ยงใน swing bucket ที่ 4,000 g นาน 10 นาที จากนั้นตรวจสอบโปรตีนที่สกัดด้วย 10%SDS/PAGE ย้อมด้วย Silver staining และ Western blot analysis ใช้ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ HA protein

ส่วนคอลัมน์ที่ใช้แล้วนำมาทำความสะอาดด้วย 2M NaCl ใน 5 mM sodium phosphate pH 7.12 ตามด้วยบัฟเฟอร์ B pH 6.00 ที่อัตราการไหล 2 ml/min จากนั้นทำความสะอาดคอลัมน์อีกครั้งที่อัตราการไหล 5 ml/min ด้วยบัฟเฟอร์ F 500 mM phosphate pH 7.20 และทำคอลัมน์ให้อิมมัตอีกครั้งด้วยบัฟเฟอร์ B ที่อัตราการไหล 5 ml/min ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำ เก็บคอลัมน์ใน 0.1 M sodium hydroxide

## 2.4 การวิเคราะห์โปรตีน

ทำการตรวจสอบโปรตีนที่ได้ในแต่ละขั้นตอนด้วยเทคนิคต่อไปนี้

1. SDS-PAGE ย้อมด้วย Silver staining
2. Western blot analysis
3. Hemagglutination Assay (HA assay)

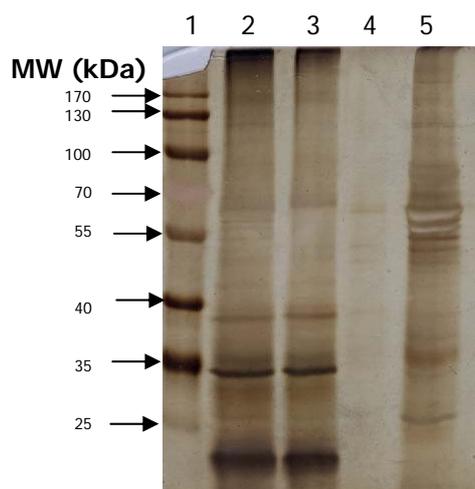
## ผลการทดลองการสกัดโปรตีน

### การแยก recombinant HA protein ออกจากเมมเบรนของเซลล์แมลง

เนื่องจาก recombinant HA protein จะถูกสร้างเป็นส่วนหนึ่งของเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์แมลง SF9 จึงต้องเริ่มดำเนินการโดยการ extract protein จากเมมเบรนของเซลล์แมลง จากการทดลองใช้สารลดแรงตึงผิวหลายชนิดในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ และสัดส่วนปริมาณของ extraction บัฟเฟอร์ต่อปริมาณเซลล์ ต่างๆ กัน รวมถึงใช้วิธีการทำให้โปรตีนหลุดออกจากเมมเบรนของเซลล์ต่างกัน พบว่า เมื่อใช้สารลดแรงตึงผิวแบบไม่มีประจุ (non-ionic detergent) คือ tergitol NP-9 เข้มข้น 0.01% ใน บัฟเฟอร์ A (20 mM sodium phosphate, 1.0 mM EDTA, 5% glycerol pH 5.89) ในอัตราส่วน 4.20 g ของน้ำหนักเซลล์เปียก : 147.5 ml ของ extraction บัฟเฟอร์ โดยวิธีการปั่นคนด้วย magnetic stirrer เพื่อหลีกเลี่ยงการทำลาย nucleus และ organelle อื่นๆ ให้ผล extract นำ recombinant HA protein ออกจากเมมเบรนของเซลล์แมลงได้ดีที่สุด (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง)

### การแยกและทำบริสุทธิ์ Recombinant HA protein ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี

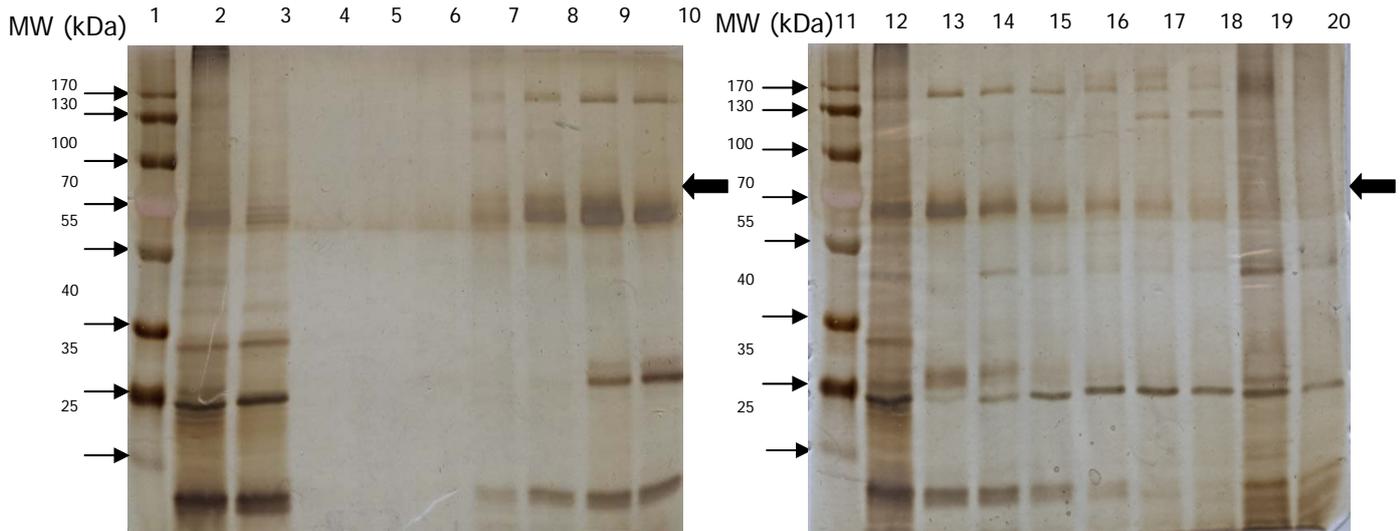
HA protein มีน้ำหนักโมเลกุล 63 kDa (คำนวณจากลำดับกรดอะมิโน) และค่า pI 6.30 ดังนั้นในการทดลองได้ปรับบัฟเฟอร์ให้มี pH ที่ pH 5.9 ทำให้ recombinant HA protein (rHA) มีประจุบวก และนำไปแยกออกจากโปรตีนที่ปนเปื้อนด้วยวิธีการผ่านตัวอย่างลงบนโครมาโตกราฟีชนิดคอลัมน์แบบการแยกโดยการแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchange) คือ Hitrap™ Q XL column (GE Healthcare/Pharmacia, Piscataway) ขนาด 1 ml ต่อเรียงกับ Hitrap™ Q FF column (GE Healthcare/Pharmacia, Piscataway) ขนาด 1 ml ทั้งนี้ โปรตีนปนเปื้อนที่มีประจุลบรวมทั้งดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอจะเกาะกับเรซินแต่ rHA จะเคลื่อนผ่าน (flow through) ซึ่งในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์หลักในการกำจัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอเป็นหลัก เนื่องผลการดำเนินการก่อนหน้านั้นพบว่าหากไม่กำจัด จะมีผลในการไปดบังการจับของ rHA โปรตีนกับ SP-Sepahrose ในขั้นตอนถัดไป ผลการดำเนินการใช้คอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุลบ QXL ตามด้วย QFF (QXL/QFF) ดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 การตรวจสอบโปรตีนด้วย 10%SDS/PAGE และย้อมสี Silver staining แสดงผลการผ่านสารสกัดโปรตีน rHA จากเซลล์ลงในคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุลบ QXL ตามด้วย QFF (QXL/QFF)

- แถวที่ 1) โปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล
- แถวที่ 2) สารสกัดโปรตีน rHA จากเซลล์ก่อนผ่าน QXL/QFF (QXL/QFF sample)
- แถวที่ 3) QXL/QFF ที่ผ่าน (flow through) คอลัมน์โดยไม่เกาะกับเรซิน
- แถวที่ 4) QXL/QFF ล้าง (wash) ด้วย บัฟเฟอร์ A
- แถวที่ 5) QXL/QFF ชะด้วย 1 M NaCl

จากรูปที่ 9 จะเห็นว่าโปรตีนบางส่วนจับกับคอลัมน์ภายหลังการผ่านตัวอย่างลงใน QXL/QFF เห็นได้จากซึ่งถูกชะออกมาด้วยเกลือความเข้มข้นสูง 1 M NaCl (แถวที่ 5) ส่วน rHA โปรตีนที่ถูกเตรียมให้มีสถานะไม่จับคอลัมน์ QXL/QFF ส่วนใหญ่หลุดออกมากับส่วน QXL/QFF flow through (แถวที่ 3) พร้อมกับโปรตีนปนเปื้อนอื่นๆ และเนื่องจากค่า pI โดยทฤษฎีของ rHA โปรตีนเท่ากับ 6.3 ดังนั้นจึงนำส่วน QXL/QFF flow through ที่มี pH 5.9 ไปแยกโปรตีนต่อด้วยโครมาโทกราฟีชนิดคอลัมน์แบบการแยกโดยการแลกเปลี่ยนประจุบวก (cation-exchange) ด้วย SP- Sepharose column เริ่มทำให้เรซินอิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ pH 5.9 เพื่อให้ rHA โปรตีนเกาะ และชะแบบ gradient ด้วยบัฟเฟอร์ที่ pH สูงขึ้นคือ pH 7.5 ได้ผลดังรูปที่ 10

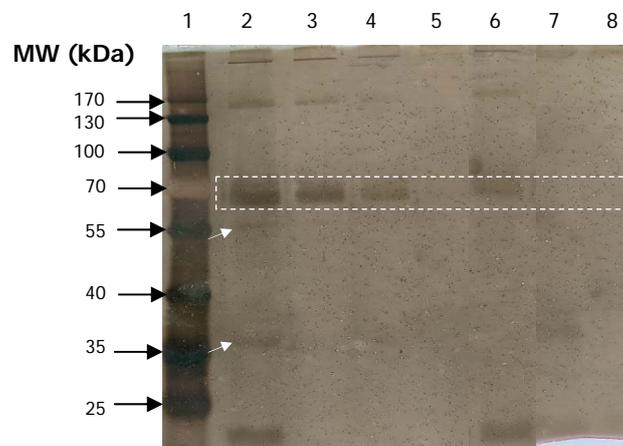


**รูปที่ 10** การตรวจสอบโปรตีนด้วย 10%SDS/PAGE และย้อมสี Silver staining แสดงผลโปรตีนหลังการผ่าน QXL/QFF และนำส่วน flow through ลงคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุบวก SP-Sepharose

- แถวที่ 1) โปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล
- แถวที่ 2) ตัวอย่างเริ่มต้นสำหรับ SP- Sepharose (หรือ QXL/QFF flow through)
- แถวที่ 3) ตัวอย่างโปรตีนส่วนที่ไม่เกาะกับ SP- Sepharose (flow through)
- แถวที่ 4) SP- Sepharose wash
- แถวที่ 5) โปรตีนจากการชะ SP- Sepharose ด้วยบัฟเฟอร์ B (0-9%)
- แถวที่ 6) โปรตีนจากการชะ SP- Sepharose ด้วยบัฟเฟอร์ B (9-13%)
- แถวที่ 7) โปรตีนจากการชะ SP- Sepharose ด้วยบัฟเฟอร์ B (14-18%)
- แถวที่ 8) โปรตีนจากการชะ SP- Sepharose ด้วยบัฟเฟอร์ B (18-25%)

- แถวที่ 9 โปรตีนจากการชะ SP- Sepharose ด้วยบัฟเฟอร์ B (25%)
  - แถวที่ 10 โปรตีนจากการชะ SP- Sepharose ด้วยบัฟเฟอร์ B (25-31%)
  - แถวที่ 11 โปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล
  - แถวที่ 12 ตัวอย่างเริ่มต้นสำหรับ SP- Sepharose (หรือ QXL/QFF flow through)
  - แถวที่ 13 โปรตีนจากการชะ SP- Sepharose ด้วยบัฟเฟอร์ B (31-40%B)
  - แถวที่ 14 โปรตีนจากการชะ SP- Sepharose ด้วยบัฟเฟอร์ B (40-55%B)
  - แถวที่ 15 โปรตีนจากการชะ SP- Sepharose ด้วยบัฟเฟอร์ B (55-70%B)
  - แถวที่ 16 โปรตีนจากการชะ SP- Sepharose ด้วยบัฟเฟอร์ B (70-87%B)
  - แถวที่ 17 โปรตีนจากการชะ SP- Sepharose ด้วยบัฟเฟอร์ B (87-100%B)
  - แถวที่ 18 โปรตีนจากการชะ SP- Sepharose ด้วยบัฟเฟอร์ B (100%B-C)
  - แถวที่ 19 และ 20 โปรตีนจากการชะ SP- Sepharose ด้วยบัฟเฟอร์ B (100%C)
- (ลูกศรชี้แสดงตำแหน่งที่คาดว่าจะเป็ rHA โปรตีน)

จากรูปที่ 10 เห็นได้ว่า fraction ที่ชะด้วย 14-18% บัฟเฟอร์ B pH 7.50 (แถวที่ 7) เริ่มเห็น rHA โปรตีน หลุดออกมาพร้อมกับโปรตีนปนเปื้อนอื่นๆ จึงนำ fraction นี้ไปแยกโปรตีนต่อด้วยการใช้โครมาโทกราฟีชนิดคอลัมน์แบบ mix mode chromatography คือ ceramic hydroxyapatite type I media (CHT type I, Bio-Rad, Hercules) ขนาด 5 ml ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นทั้ง ion exchange และ hydrophobic โดยใช้หลักการเพิ่มความเข้มข้นของ phosphate buffer เพื่อชะ rHA โปรตีนออกจากคอลัมน์ ดังผลในรูปที่ 11



**รูปที่ 11** การตรวจสอบโปรตีนด้วย 10%SDS/PAGE และย้อมสี Silver staining แสดงผลโปรตีนหลังการผ่าน QXL/QFF, SP-Sepharose (ที่ชะด้วย 14-18% บัฟเฟอร์ B) และ ceramic hydroxyapatite type I (CHT)

- แฉวที่ 1 โพรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล
- แฉวที่ 2 ตัวอย่างโพรตีน ก่อนนำลง CHT คอลัมน์ (จาก SP-Sepharose18-25%บัฟเฟอร์

B)

- แฉวที่ 3 CHT flow through
- แฉวที่ 4 CHT wash
- แฉวที่ 5 CHT ชะด้วย buffer D (40 mM phosphate) fraction 1
- แฉวที่ 6 CHT ชะด้วย buffer D (40 mM phosphate) fraction 2
- แฉวที่ 7 CHT ชะด้วย buffer E (100 mM phosphate )
- แฉวที่ 8 CHT ชะด้วย buffer (F 500 mM phosphate)

(ลูกศรชี้ คือ โพรตีนที่ถูกกำจัดหลังจากใช้ CHT คอลัมน์ กรอบเส้นประ แสดงตำแหน่ง rHA โพรตีน (ถ้ามี)บน SDS/PAGE)

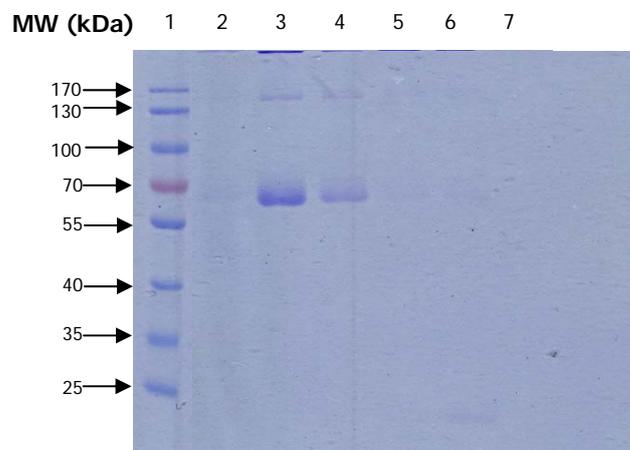
ในรูปที่ 11 จะเห็นว่า มี rHA โพรตีนบางส่วนไม่เกาะกับคอลัมน์ดังเห็นได้จากแฉวที่ 3 CHT flow through และแฉวที่ 4 CHT wash ที่พบว่า มีแถบโพรตีนขนาดเดียวกับ rHA โพรตีนหลุดออกมา ซึ่งอาจเกิดจากการมีโพรตีนมากกว่าบริเวณให้โพรตีนเกาะในคอลัมน์หรือสภาวะในการให้ rHA โพรตีนไปเกาะยังไม่ใช่สภาวะที่เหมาะสม ส่วน rHA โพรตีนที่เกาะกับคอลัมน์นั้นถูกชะจาก CHT คอลัมน์ด้วย 40 mM phosphate พร้อมแถบโพรตีนปนเปื้อนที่มีขนาดใหญ่กว่า 2 แถบโพรตีนและที่เล็กกว่า 25 kDa 1 แถบโพรตีน เมื่อเปรียบเทียบโพรตีนก่อนการสกัดด้วย CHT คอลัมน์ (แฉวที่ 2) กับภายหลังการชะออกจากคอลัมน์ด้วย buffer D (40 mM phosphate) fraction 2 (แฉวที่ 6) พบว่าแถบโพรตีนที่ขนาดประมาณ 56 kDa และ 36 kDa (ตามลูกศรชี้ รูปที่ 3) ไม่รวมอยู่ด้วย ทั้งนี้ น่าจะมาจากการที่ 2 แถบโพรตีนนี้เกาะกับเรซินได้ดีกว่า rHA โพรตีน จึงถูกชะออกจากคอลัมน์ภายหลังการให้ rHA โพรตีนหลุดออกมาแล้วโดยการชะด้วย buffer E (100 mM phosphate) ในแฉวที่ 7 ส่วนโพรตีนปนเปื้อนอื่นๆ ที่มีขนาดใหญ่กว่า rHA โพรตีนและขนาดเล็กกว่า 25 kDa นั้นดูเหมือนว่ามีคุณสมบัติในการเกาะกับ CHT คอลัมน์ใกล้เคียงกับ rHA โพรตีนเนื่องจากถูกชะออกมาด้วยกัน (แฉวที่ 6)

ผลดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่า rHA โพรตีนนั้นเกาะกับคอลัมน์ CHT ได้ไม่สนิท เห็นได้จากการตรวจพบในส่วนโพรตีนที่ผ่าน (CHT flow through) และที่หลุดมาจากขณะล้าง (CHT wash) ด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการเกาะ แต่มีโพรตีนปนเปื้อน 2 แถบโพรตีนที่เกาะได้ดีกว่า คือ แถบโพรตีนที่ขนาดประมาณ 56 kDa และ 36 kDa ที่ไม่พบใน flow through และใน wash เลย แต่กับถูกชะออกเมื่อใช้บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นของ phosphate สูงกว่าที่ใช้ชะ rHA โพรตีน แสดงการเกาะกับ CHT ได้ดีกว่า ส่วนโพรตีนปนเปื้อนอื่นๆ คือ แถบโพรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่า rHA โพรตีน 2 แถบโพรตีน พบว่ามีคุณสมบัติในการจับและหลุดออกจาก CHT เช่นเดียวกับ rHA โพรตีน สำหรับโพรตีนที่เล็กกว่า 25 kDa นั้นพบว่าเกาะกับคอลัมน์ CHT ได้ใกล้เคียงกับ rHA โพรตีนด้วยเช่นกัน เห็นได้จากการถูกชะในช่วงที่ใช้บัฟเฟอร์ D ด้วย จากที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่า ในการทำให้ rHA โพรตีนบริสุทธิ์โดยการให้จับกับคอลัมน์ CHT ไม่สามารถแยกเฉพาะ rHA โพรตีนออกมาเพียงโพรตีนเดียวโดยไม่มีโพรตีนอื่นหลุดออกมาด้วย เมื่อใช้บัฟเฟอร์สำหรับชะคอลัมน์ ดังนั้นอาจจะไม่ใช่แนวทางที่เหมาะสมในการสกัด rHA โพรตีนให้บริสุทธิ์ขั้นสุดท้าย

จากผลที่ได้มีสิ่งสมควรสังเกตเพิ่มเติม คือ ส่วนของ CHT flow through คือ โพรตีนที่ไม่เกาะกับ CHT คอลัมน์นั้นมีเพียง rHA โพรตีนเป็นโพรตีนหลัก (รูปที่ 3 แฉวที่ 3) ทั้งนี้ยังพบผลเช่นเดียวกันในส่วนของ CHT wash (รูปที่ 3 แฉวที่ 4) ด้วย โดยทั้งสองตัวอย่างโพรตีนพบเพียงแถบของ

rHA โปรตีนกับโปรตีนขนาดใหญ่กว่า 2 แล็บโปรตีนเท่านั้น ซึ่งเมื่อนำตัวอย่างโปรตีนภายหลังการใช้ CHT คอลัมน์ไปทำให้เข้มข้นเพิ่มขึ้นด้วย centrifugal concentrator ที่ molecular weight cut off 50 kDa และตรวจสอบด้วยการย้อมสี Coomassie Blue staining พบว่าตัวอย่าง CHT flow through และ CHT wash (รูปที่ 12 แถวที่ 3 และ 4 ตามลำดับ) มี rHA โปรตีนกับโปรตีนขนาดใหญ่ 2 แล็บโปรตีนเป็นโปรตีนหลักเท่านั้น

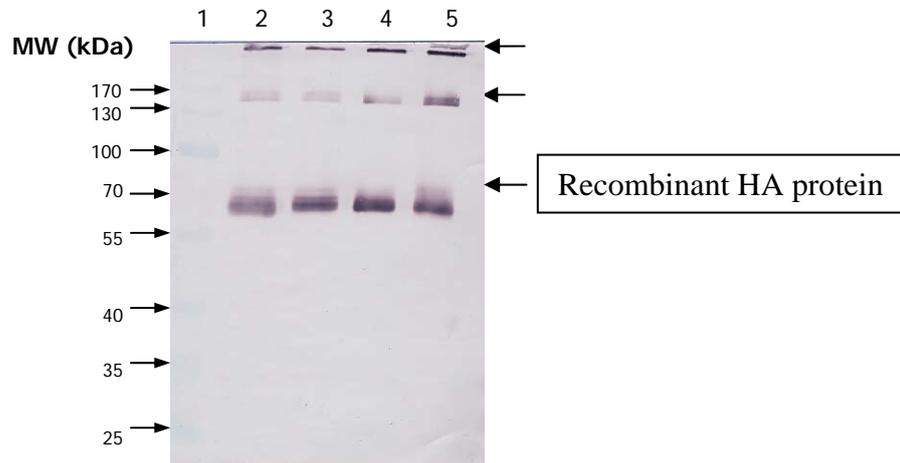
เมื่อทำการตรวจสอบ rHA โปรตีนในตัวอย่างทั้งก่อนและหลังการสกัดด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแต่ละชนิดด้วยเทคนิค Western blot analysis โดยใช้ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ HA โปรตีนก็พบแล็บโปรตีนที่จำเพาะกับ anti-HA antibody ในทุกตัวอย่างดังแสดงในรูปที่ 5 แสดงการมี rHA โปรตีนไม่ได้สูญหายไปแต่ละขั้นตอน นอกจากนี้ Western blot analysis ยังชี้ให้เห็นว่าโปรตีนขนาดใหญ่ 2 แล็บโปรตีน ที่ตรวจพบในทุกตัวอย่างถูกแอนติบอดีจับอย่างจำเพาะ แสดงว่าโปรตีนขนาดใหญ่ทั้งสองนี้น่าจะเป็น rHA โปรตีนที่เกิดจากการ polymerization ของ HA เป็น dimer หรือ trimer ดังแสดงในรูปที่ 12 และเพื่อยืนยันว่าทุกตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับ Western blot ในรูปที่ 13 เป็น recombinant HA protein จริง จึงได้นำตัวอย่างดังกล่าวมาทำการตรวจสอบว่าโปรตีนตัวอย่างดังกล่าวมี Hemagglutination activity ตามหน้าที่ของโปรตีนตามธรรมชาติหรือไม่ โดยทดสอบด้วย HA assay ตรวจสอบความสามารถในการ agglutination ของเม็ดเลือดแดงห่าน (0.5% goose red blood cell) โดยการนำตัวอย่างโปรตีนมาเจือจางแบบ two-fold dilution ด้วย PBS และผสมกับเม็ดเลือดแดงที่เตรียมใน 96-well plate ผลการตรวจสอบดังแสดงในรูปที่ 14



**รูปที่ 12** การตรวจสอบโปรตีนด้วย 10%SDS/PAGE และย้อมสี Coomassie Blue staining แสดงผลโปรตีนหลังการผ่าน CHT คอลัมน์ และเพิ่มความเข้มข้นด้วย centrifugal concentrator ที่ molecular weight cut off 50 kDa

- แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล
- แถวที่ 2 โปรตีนหลังการผ่าน SP-Sepharose (โปรตีนก่อนการสกัดด้วย CHT)
- แถวที่ 3 CHT flow through ทำให้เข้มข้น 43 เท่า
- แถวที่ 4 CHT wash pH ทำให้เข้มข้น 56 เท่า

แถวที่ 5 โปรตีนหลังการผ่าน CHT และชะด้วย buffer D fraction ที่ 1 ทำให้เข้มข้น 31 เท่า  
 แถวที่ 6 โปรตีนหลังการผ่าน CHT และชะด้วย buffer D fraction ที่ 2 ทำให้เข้มข้น 31 เท่า  
 แถวที่ 7 โปรตีนหลังการผ่าน CHT และชะด้วย buffer E 100 mM phosphate  
 แถวที่ 8 โปรตีนหลังการผ่าน CHT และชะด้วย buffer F



**รูปที่ 13** Western blot analysis แสดงตัวอย่างโปรตีนก่อนและหลังการแยกด้วยโครมาโตกราฟี แถว

โปรตีนแสดงความจำเพาะกับแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีน HA

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล

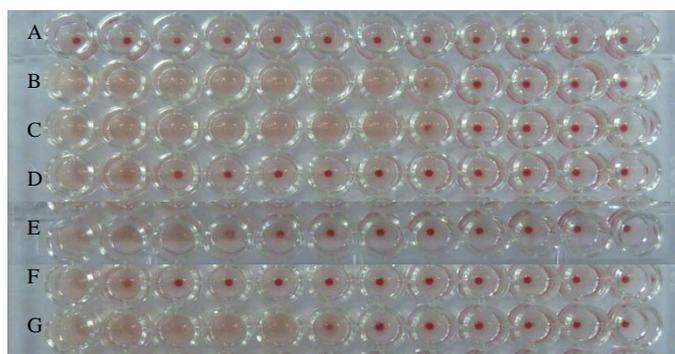
แถวที่ 2 ตัวอย่างโปรตีนก่อนการแยกด้วยโครมาโตกราฟี (QXL/QFF sample)

แถวที่ 3 QXL/QFF flow through (หรือ SP-Sepharose sample)

แถวที่ 4 SP-Sepharose ชะด้วย 18-25% บัฟเฟอร์ B pH 6.27 (CHT sample)

แถวที่ 5 CHT elute buffer D 40 mM phosphate fraction ที่ 1 ทำให้เข้มข้นด้วย

centrifugal concentrator molecular weight cut off 50 kDa



**รูปที่ 14** การตรวจสอบตัวอย่างโปรตีนด้วย Hemagglutination assay ใช้ 0.5% goose red blood cell

แถว A คือ PBS (negative control)

แถว B คือ ตัวอย่างโปรตีนก่อนการแยกด้วยโครมาโตกราฟี (QXL/QFF sample)

แถว C คือ QXL/QFF flow through (หรือ SP-Sepharose sample)

แถว D คือ SP-Sepharose ชะด้วย 18-25% บัฟเฟอร์ B pH 6.27 (CHT sample)

แถว E คือ CHT elute buffer D 40 mM phosphate fraction ที่ 1 ทำให้เข้มข้นด้วย centrifugal concentrator molecular weight cut off 50 kDa

จากรูปที่ 14 พบว่าตัวอย่างโปรตีนที่ให้ผลบวกกับ Western blot analysis มี Hemagglutination activity โดยแต่ละตัวอย่างมี HA activity ที่ต่างกันเนื่องจากปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่างที่ไม่เท่ากัน

### สรุปผลการทดลองการสกัดและทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนต์ HA โปรตีน

1. จากการแยกและทำบริสุทธิ์ rHA โปรตีนด้วยวิธีโครมาโตกราฟีชนิดคอลัมน์เป็นลำดับ คือ QXL/QFF, SP-Sepharose และ CHT นั้น เมื่อตรวจสอบด้วย SDS-PAGE พบว่าสามารถกำจัดสารพันธุกรรมและโปรตีนปนเปื้อนให้แยกออกจาก rHA โปรตีน ได้ตามลำดับ โดยในขั้นตอนสุดท้ายจากการใช้ CHT คอลัมน์พบว่าตัวอย่างโปรตีนที่ชะออกจากคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ D มี rHA โปรตีนและโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่า 2 แลบโปรตีน ซึ่งเมื่อตรวจสอบด้วย Western blot analysis พบว่าน่าจะเป็น rHA โปรตีนที่เกิดจากการ polymerization อย่างไรก็ตามพบว่ามีอีก 1 โปรตีนปนเปื้อน คือ แลบโปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่า 25 kDa ซึ่งหากเปรียบเทียบความเข้มของแลบโปรตีนระหว่าง rHA โปรตีนและโปรตีนปนเปื้อนขนาดเล็กกว่า 25 kDa นี้พบว่ามีปริมาณใกล้เคียงกัน (รูปที่ 12 แถวที่ 5 และ 6) ดังนั้นตัวอย่างนี้ยังต้องการขั้นตอนต่อไปในการให้ได้ rHA โปรตีนที่ปราศจากการปนเปื้อน

2. นอกจากตัวอย่างที่ได้จากการชะออกจาก CHT คอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ D ตามข้อที่ 1 แล้ว เมื่อตรวจสอบตัวอย่างโปรตีน 2 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างโปรตีนที่ไม่เกาะกับ CHT คอลัมน์ (CHT flow through) และที่ได้จากการล้างคอลัมน์ (CHT Wash) (รูปที่ 12 แถวที่ 3 และ 4) กลับมี rHA โปรตีนในปริมาณสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างโปรตีนอื่นๆที่ได้จาก CHT คอลัมน์ อีกทั้งไม่เห็นโปรตีนปนเปื้อนขนาดเล็กกว่า 25 kDa ดังนั้นอีกทางเลือกหนึ่งในการแยก rHA โปรตีนให้บริสุทธิ์นอกจากการให้เกาะกับ CHT คอลัมน์และชะออก อาจใช้วิธีการตรงกันข้าม คือให้โปรตีนปนเปื้อนอื่นๆ โดยเฉพาะโปรตีนปนเปื้อนขนาดเล็กกว่า 25 kDa เกาะกับ CHT คอลัมน์แต่ให้ rHA โปรตีนเท่านั้นผ่านคอลัมน์ ซึ่งน่าจะให้ rHA โปรตีนที่ปราศจากการปนเปื้อนจากโปรตีนอื่นๆ โดยไม่ต้องมีขั้นตอนเพิ่มเติมอีก

3. ในขั้นตอนสุดท้ายที่ทำการแยกโปรตีนด้วย CHT คอลัมน์นั้น จากการทำ Western blot analysis พบว่าทุกตัวอย่างโปรตีนที่ได้ทั้งข้อ 1 และ 2 ข้างต้นมี rHA โปรตีนอยู่ด้วยโดย rHA โปรตีนดังกล่าวมี Hemagglutination activity ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่ากระบวนการแยก rHA โปรตีนได้ผลโดยใช้ขั้นตอน คือ เริ่มจากการใช้ QXL/QFF และนำส่วน flow through มาลง SP-Sepharose คอลัมน์ จากนั้นชะโปรตีนออกจาก SP-Sepharose ด้วย 18-25% บัฟเฟอร์ B เพื่อนำไปลง CHT คอลัมน์ ซึ่งตัวอย่างโปรตีนที่มี rHA โปรตีนที่มีโปรตีนปนเปื้อนน้อยที่สุดหรือไม่พบเลย คือ ตัวอย่างโปรตีนที่ไม่เกาะกับ CHT คอลัมน์

## 2.5 การทดสอบบรีคอมบีแนนต์ HA โปรตีนในสัตว์ทดลอง

เพื่อตรวจสอบความสามารถในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันของโปรตีนที่ผลิตและทำบริสุทธิ์ได้ในหนูทดลอง ซึ่งดำเนินการทดลองโดยฉีดโปรตีนเพื่อกระตุ้นการสร้างภูมิ 3 ครั้ง ห่างกัน 1 สัปดาห์ จากนั้นทำการเก็บวีรัสมาวิเคราะห์หาภูมิคุ้มกันเปรียบเทียบกับซีรัมของหนูก่อนการฉีดโปรตีนกระตุ้น

### วิธีการฉีดโปรตีนกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนู (Immunization of mice)

หนูที่ใช้ในการทดลอง : female Balb/c mice (Six to eight-week-old pathogen-free) จาก National Laboratory Animal Centre เลี้ยง ที่อุณหภูมิ 22-24°C ให้อาหารและน้ำอย่างเพียงพอ

### ทำการเจาะเลือดหนูก่อนการฉีดกระตุ้นครั้งที่ 1

#### การฉีดหนู

กลุ่มควบคุม ฉีด PBS จำนวน 4 ตัว และฉีดโปรตีน recombinant HA protein 50  $\mu\text{g}$ /ตัว จำนวน 4 ตัว

Immunization: intramuscular (IM) 3 ครั้ง ห่างกัน 1 สัปดาห์ (อาทิตย์ที่ 1, 2 และ 3) และ sacrificed ในอาทิตย์ที่ 4 โดยเก็บ whole blood เพื่อแยกซีรัม

ครั้งที่ 1 (สัปดาห์ที่ 1) 50  $\mu\text{g}$  recombinant HA protein (50  $\mu\text{l}$ ) ผสม Complete Freund's adjuvant (50  $\mu\text{l}$ ) ใน total volume 100  $\mu\text{l}$

ครั้งที่ 2 (สัปดาห์ที่ 2) 50  $\mu\text{g}$  recombinant HA protein (50  $\mu\text{l}$ ) ผสม Incomplete Freund's adjuvant (50  $\mu\text{l}$ ) ใน total volume 100  $\mu\text{l}$

ครั้งที่ 3 (สัปดาห์ที่ 3) 50  $\mu\text{g}$  recombinant HA protein (50  $\mu\text{l}$ ) ผสม Incomplete Freund's adjuvant (50  $\mu\text{l}$ ) ใน total volume 100  $\mu\text{l}$

#### ผลการทดสอบโปรตีนในหนู

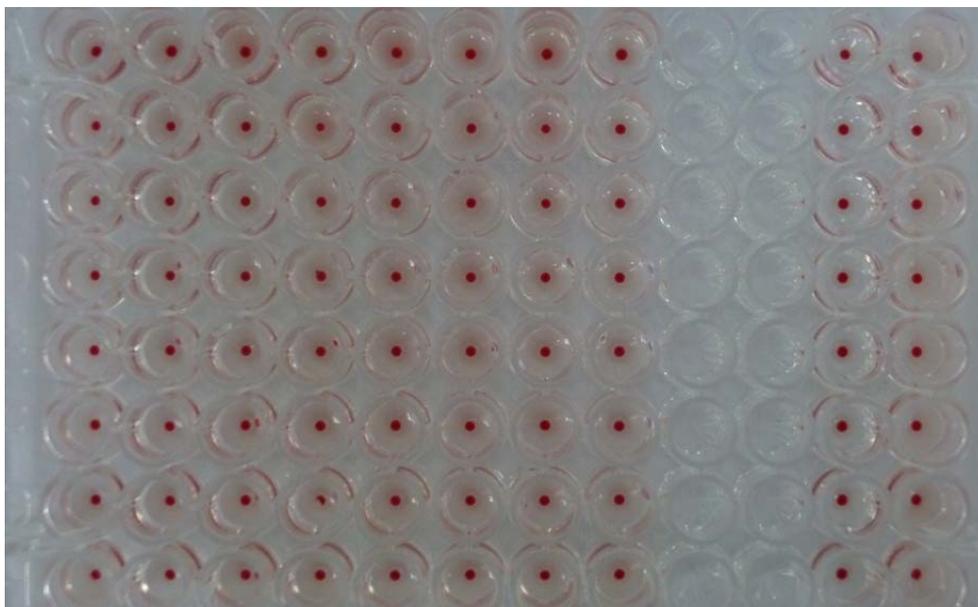
รายงานผลการตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อ HA antigen ในซีรัมด้วยวิธี Hemagglutination Inhibition (HAI)

1. การเตรียมเม็ดเลือดแดง 0.5%
  - 1.1 นำเลือดห่านในสารละลาย Alsever's ประมาณ 5 ml มาผสมกับสารละลาย Normal saline, 0.85% NaCl จนได้ปริมาตร 50 ml ในหลอดกั้นกรวยสำหรับปั่นเหวี่ยง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,200 rpm นาน 10 นาที แล้วเทสารละลายส่วนบน ซึ่งมีสีน้ำตาลอมเหลืองทิ้ง
  - 1.2 เติมสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) ไปเพื่อล้างเม็ดเลือดแดงจนปริมาตรครบ 50 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,200 rpm นาน 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งไป ทำเช่นนี้อีก 2 รอบ

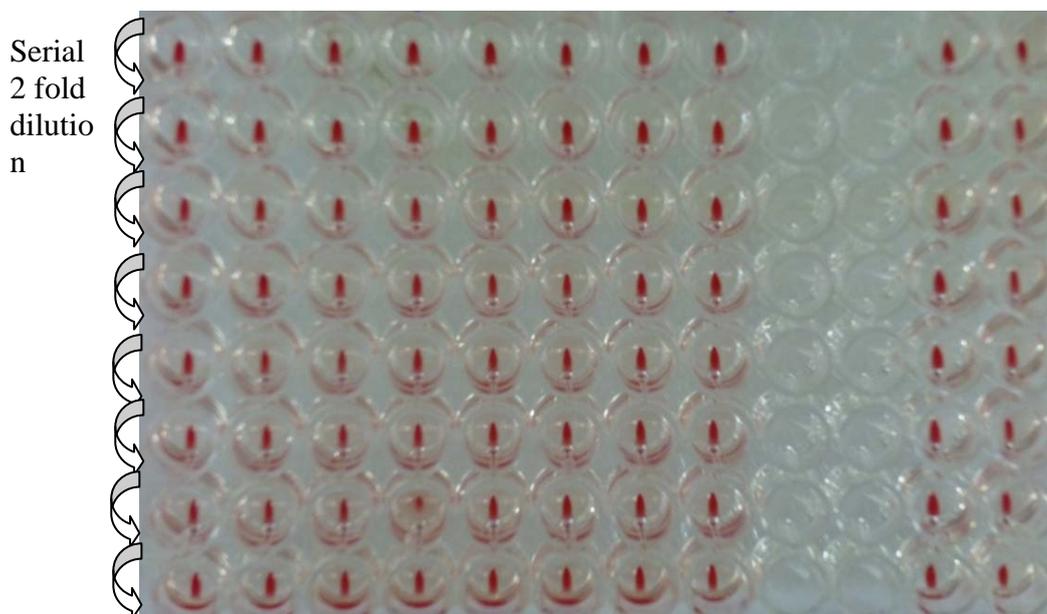
- 1.3 นำสารละลายเม็ดเลือดแดงที่ได้ใส่ลงในหลอดก้นกรวยสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 15 ml แล้วเติมสารละลาย PBS จนได้ปริมาตร 12 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,200 rpm นาน 10 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งไปจะได้เม็ดเลือดแดงเข้มข้น (packed red blood cells)
- 1.4 ทำการเจือจางเม็ดเลือดแดงเข้มข้นด้วยสารละลาย PBS เพื่อเตรียมสารละลายเม็ดเลือดแดงความเข้มข้นโดยประมาณ 0.5% จุดปริมาตรเริ่มต้นที่เตรียมไว้เพื่อนำไปคำนวณ
- 1.5 ทำการเจือจางเม็ดเลือดแดง 0.5% โดยประมาณที่ได้ต่ออีก 100 เท่า เพื่อนำไปนับจำนวนเม็ดเลือดแดงโดยปิเปตต์เม็ดเลือดแดงที่เจือจางแล้วปริมาตร 10  $\mu$ l ลงบน hemacytometer และนับจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดที่บริเวณมุมทั้ง 4 ด้าน บันทึกจำนวนที่นับได้ทั้งหมดเพื่อนำไปคำนวณ
- 1.6 ปรับความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดง 0.5% ที่เตรียม โดยคำนวณหาปริมาตรสุดท้ายของเม็ดเลือดแดง 0.5% จากสูตร  

$$\text{ปริมาตรสุดท้ายของเม็ดเลือดแดง 0.5\%} = (\text{จำนวนเม็ดเลือดแดงที่นับได้} / 160) \times \text{ปริมาตรเริ่มต้น}$$
2. การเตรียมซีรัม
  - 2.1 การ treat ซีรัม เพื่อกำจัด Nonspecific Inhibitor  
 นำซีรัมที่ได้จากหนูทดลอง 8 ตัวทั้งก่อนและหลังการ immunization มาผสมกับ receptor destroying enzyme (RDE; RDE II SEIKEN) ในอัตราส่วน 1 : 3 แล้วนำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37° C นาน 18-20 ชั่วโมง และต่อด้วยอุณหภูมิ 56° C นาน 30 นาที
  - 2.2 การ treat ซีรัม เพื่อกำจัด Nonspecific Agglutinins  
 นำซีรัมที่ treat แล้วด้วย RDE มาผสมให้เข้ากันกับ packed red blood cells ในอัตราส่วน 20 : 1 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4° C นาน 1 ชั่วโมง โดยเขย่าให้เข้ากันทุก 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,200 rpm นาน 10 นาที ดูดเอาเฉพาะสารละลายส่วนใสด้านบน จะได้ซีรัมสำหรับทดสอบ HAI ที่การเจือจางเริ่มต้น 1 : 4
  - 2.3 การทดสอบซีรัม  
 เพื่อตรวจหาว่าในซีรัมที่ผ่านการ treat แล้วมี Nonspecific Agglutinin หรือไม่ ทำโดยปิเปตต์ซีรัม ปริมาตร 50  $\mu$ l ใส่ลงในหลุมแรกของแต่ละคอลัมน์ของไมโครเพลทชนิด 96 หลุมที่มีก้นหลุมเป็นรูปตัววี ส่วนหลุมควบคุมใส่สารละลาย PBS แทนซีรัม แล้วทำการเจือจางแบบ serial twofold dilution ในปริมาตร 25  $\mu$ l ด้วยสารละลาย PBS จากนั้นเติมเม็ดเลือดแดง 0.5% ลงไป หลุมละ 50  $\mu$ l เขย่าเพลทเพื่อผสมสารในหลุมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4° C นาน 30 นาทีหรือจนกว่าเม็ดเลือดแดงในหลุมควบคุมจะตกลงมาอย่างสมบูรณ์เห็นเป็นเม็ดกระดุมที่ก้นหลุมซึ่งเมื่อเอียง

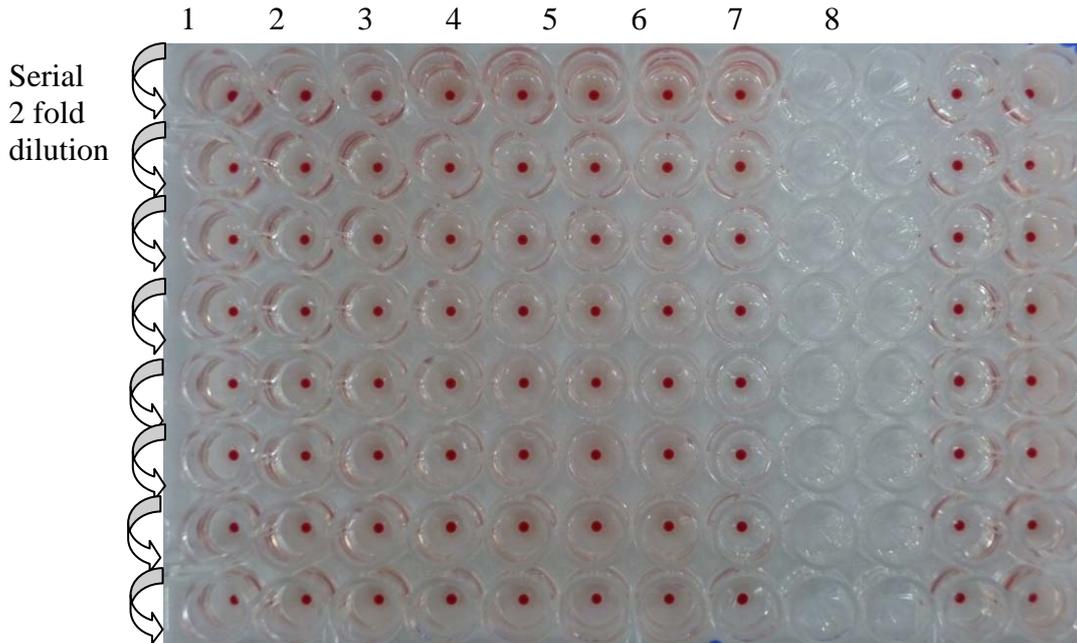
เพลาจะพบการไหลของเม็ดเลือดแดง จึงอ่านผล โดยหากในซีรัมมี nonspecific agglutinins อยู่จะทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของเม็ดเลือด (hemagglutination) ได้ผลที่ต่างไปจากหลุมควบคุม ผลการทดสอบแสดงดังรูปที่ 15



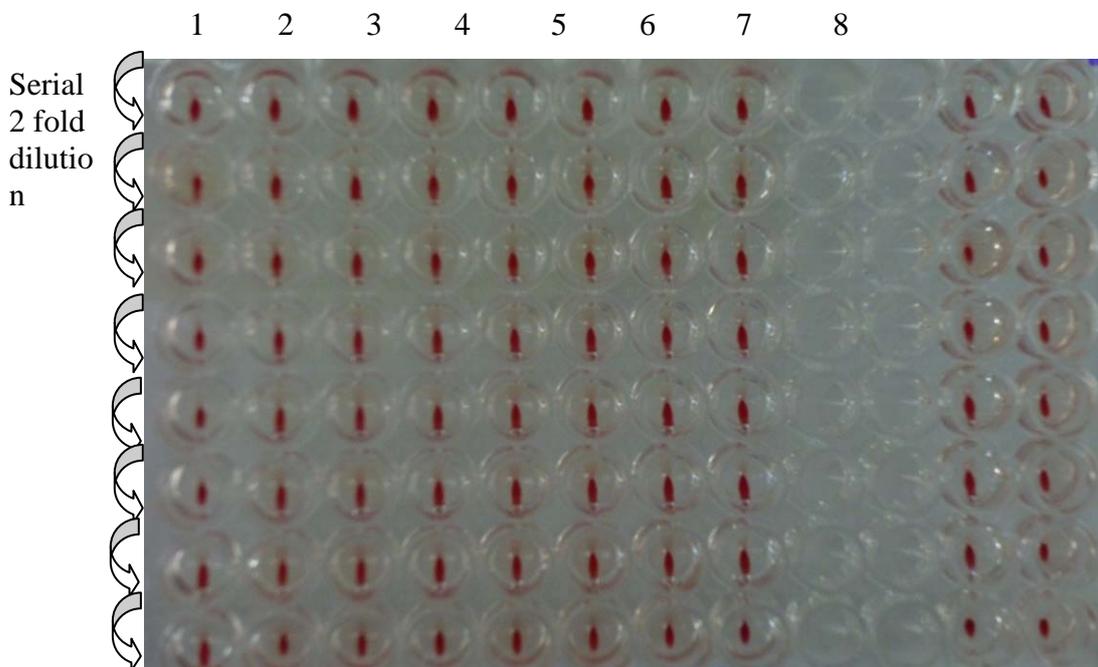
รูปที่ 15a แสดงการทดสอบซีรัมเพื่อตรวจหา Nonspecific Agglutinin ตัวอย่างหมายเลข 1-8 คือ ซีรัมที่ผ่านการ treat แล้วของหนูทดลอง 8 ตัวก่อนการ immunization ตัวอย่างหมายเลข 9 คือ monoclonal antibody ต่อ H5N1HA antigen ที่การเจือจาง 1: 2,000 ซึ่งจะใช้เป็น positive control ในการทดสอบ HAI ส่วน PBS คือ หลุมควบคุม



รูปที่ 15b แสดงการทดสอบซีรัมเช่นเดียวกับรูปที่ 1a เมื่อเอียงเพลทแล้วพบว่าเกิดการไหลของเม็ดเลือดแดง



รูปที่ 15c แสดงการทดสอบซีรัมเพื่อตรวจหา Nonspecific Agglutinins ตัวอย่างหมายเลข 1-8 คือ ซีรัมที่ผ่านการ treat แล้วของหนูทดลอง 8 ตัวหลังการ immunization ตัวอย่างหมายเลข 9 คือ monoclonal antibody ต่อ H5N1HA antigen ที่การเจือจาง 1: 2,000 ซึ่งจะใช้เป็น positive control ในการทดสอบ HAI ส่วน PBS คือ หลุมควบคุม



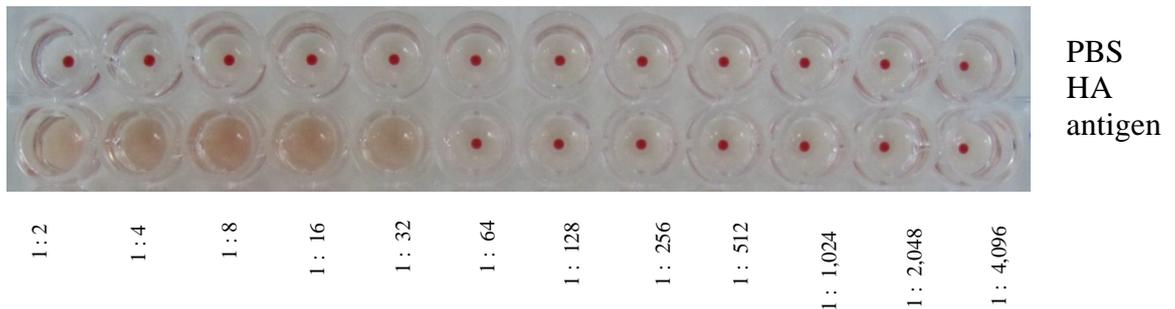
รูปที่ 15d แสดงการทดสอบซีรัมเช่นเดียวกับรูปที่ 1c เมื่อเอียงเพลทแล้วพบว่าเกิดการไหลของเม็ดเลือดแดง

จากรูปที่ 15 แสดงให้เห็นว่าตรวจไม่พบ Nonspecific Agglutinins ในซีรัมที่ผ่านการ treat แล้ว ของหนูทดลอง 8 ตัวทั้งก่อนและหลังการ immunization เช่นเดียวกับ monoclonal antibody ต่อ H5N1 HA antigen ที่การเจือจาง 1: 2,000 ซึ่งจะใช้เป็น positive control ในการทดสอบ HAI

### 3. การเตรียม HA antigen

#### 3.1 ทดสอบคุณสมบัติการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของ HA antigen โดยวิธี Hemagglutination (HA test)

เพื่อหาความสามารถในการทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination) เป็นค่า HA titer ในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม ที่มีก้นหลุมเป็นรูปตัววี โดยทำการเจือจาง HA antigen ปริมาตร 50  $\mu\text{l}$  แบบ serial twofold dilution เริ่มจาก 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8,...ไปจนถึง 1 : 4,096 ด้วยสารละลาย PBS จากนั้นเติมเม็ดเลือดแดง 0.5% ปริมาตร 50  $\mu\text{l}$  แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 30-45 นาที หรือจนกว่าในหลุมควบคุมซึ่งใส่สารละลาย PBS แทน HA antigen จะเห็นเม็ดเลือดแดง รวมกลุ่มเป็นเม็ดกระดุมแล้ว อ่านผลการทดสอบโดยหลุมที่ให้ผลบวกจะเกิดการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง ส่วนผลลบคือเม็ดเลือดจะตกลงเป็นเม็ดกระดุมที่ก้นหลุมได้ผลดังรูปที่ 16

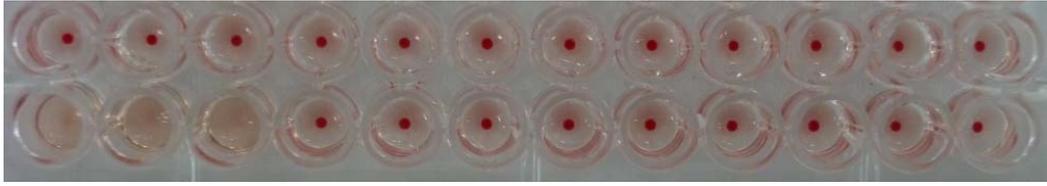


จากรูปที่ 16 จะพบว่า HA antigen ในปริมาตร 50  $\mu\text{l}$  ที่การเจือจาง 1 : 32 มีค่า HA titer เท่ากับ 1 Hemagglutinating unit (HAU) ดังนั้น HA antigen ที่ไม่ได้เจือจางจึงมีค่า HA titer เท่ากับ 32 HAU/50 $\mu\text{l}$

#### 3.2 การเตรียมแอนติเจนมาตรฐานสำหรับการทดสอบ HAI

3.2.1 คำนวณหาปริมาตรของ HA antigen ทั้งหมดที่ต้องใช้ในการทดสอบก่อน โดยแต่ละหลุมใช้ปริมาตร 25 $\mu\text{l}$

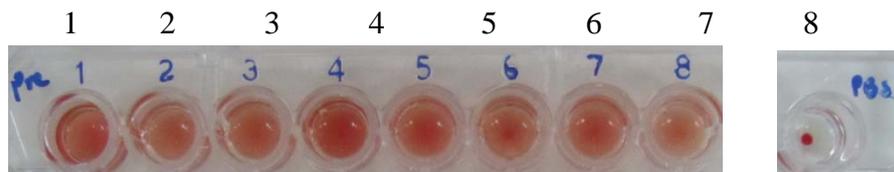
3.2.2 มาตรฐานความเข้มข้นของแอนติเจนสำหรับการทดสอบ HAI คือ 4 HAU เตรียมโดยเจือจาง HA antigen ที่ทราบ HA titer แล้วด้วยสารละลาย PBS จนได้ 8 HAU/ 50  $\mu\text{l}$  ปริมาตรเพียงพอสำหรับใช้ทดสอบ จากนั้นทำ black titration เพื่อยืนยันความเข้มข้นของแอนติเจน โดยการเตรียม HA antigen ความเข้มข้น 8 HAU/ 50  $\mu\text{l}$  แล้วทำ HA test ตามวิธีข้อ 3.1 ผลที่ได้ควรจะบวกใน 3 หลุมแรก ดังรูปที่ 17



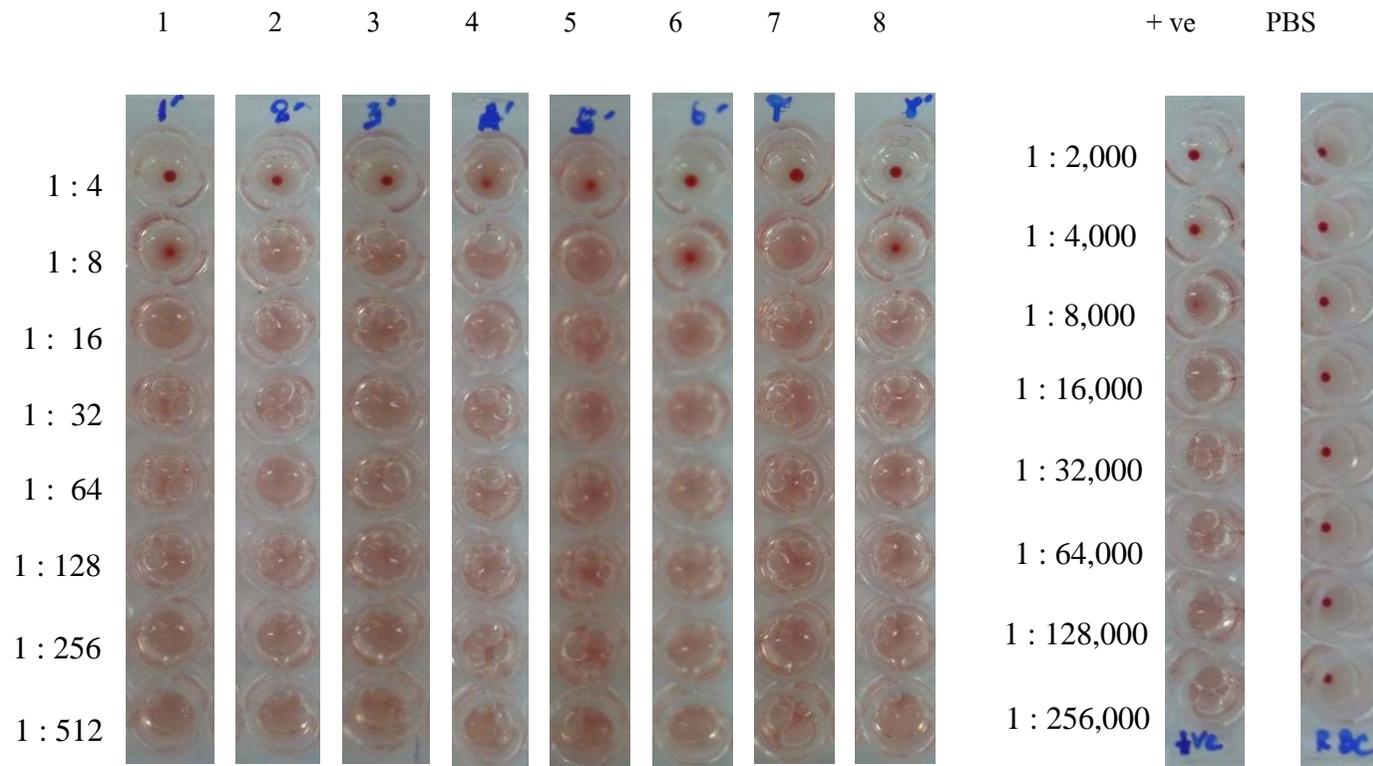
รูปที่ 17 การทำ black titration เพื่อยืนยันความเข้มข้น 8 HAU/ 50  $\mu$ l ของ HA antigen

#### 4. การทดสอบ HAI

เพื่อหาความสามารถของซีรัมในการยับยั้งการเกิด hemagglutination เป็นค่า “Antibody titer” โดยทำการเจือจางซีรัมที่ผ่านการตรวจแล้วว่าไม่มี Nonspecific Agglutinins ในปริมาตร 25  $\mu$ l แบบ two fold dilution ด้วยสารละลาย PBS ในไมโครเพลทชนิด 96 หลุม ที่มีก้นหลุมเป็นรูปตัววี โดยเริ่มจากการเจือจาง 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, ... ไปจนถึง 1 : 512 จากนั้นเติม HA antigen ความเข้มข้น 8 HAU/ 50  $\mu$ l ปริมาตร 25  $\mu$ l เพื่อจะได้ความเข้มข้นของแอนติเจนต่อหลุมเท่ากับ 4 HAU แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4  $^{\circ}$ C นาน 40 นาที จากนั้นเติมเม็ดเลือดแดง 0.5% ปริมาตร 50  $\mu$ l บ่มต่อที่อุณหภูมิ 4  $^{\circ}$ C นาน 40 นาที จึงอ่านผล ให้ดูเทียบกับ + ve control คือ monoclonal antibody ต่อ H5N1 HA antigen เริ่มที่การเจือจาง 1 : 2,000 (1  $\mu$ g/ml) ซึ่งจะให้ผลบวก คือเม็ดเลือดแดงตกลงเห็นเป็นเม็ดกระดุมที่ก้นหลุมเนื่องจาก HA antigen จับกับ antibody แล้วจึงไม่สามารถทำให้เกิด การจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination inhibition) ส่วนผลลบ คือหลุมที่เกิดการจับกลุ่มของเม็ดเลือดแดง (hemagglutination) เนื่องจาก HA antigen ไม่ถูกจับกับ antibody จึงทำให้เกิด hemagglutination ได้ดังรูปที่ 18



รูปที่ 18a แสดงผลการทดสอบ HAI ตัวอย่างหมายเลข 1 ถึง 8 คือซีรัมของหนู 8 ตัวก่อนการ immunization และหลุมควบคุมซึ่งใช้สารละลาย PBS แทนแอนติเจนและแอนติบอดี



รูปที่ 18b แสดงผลการทดสอบ HAI ตัวอย่างหมายเลข 1 ถึง 8 คือซีรัมของหนู 8 ตัวที่ผ่านการ immunization แล้ว สำหรับหลุมควบคุม+ ve คือ monoclonal antibody ต่อ H5N1 HA antigen เริ่มที่การเจือจาง 1: 2,000 และหลุมควบคุมซึ่งใช้สารละลาย PBS แทนแอนติเจนและแอนติบอดี

จากรูปที่ 18a พบว่าซีรัมจากเลือดหนูทดลองก่อนการ immunization หมายเลข 1 ถึง 8 ให้ผล HAI เป็นลบ ที่การเจือจาง 1: 4 สำหรับรูปที่ 18b พบว่าซีรัมจากหนูทดลองหลังการ immunization หมายเลข 1 6 และ 8 ให้ผล HAI เป็นบวกที่การเจือจางสุดท้ายคือ 1: 8 ซีรัมจากหนูทดลองหมายเลข 2 3 4 5 และ 7 ให้ผล HAI เป็นบวกที่การเจือจางสุดท้าย 1: 4 ส่วน monoclonal antibody ต่อ H5N1 HA antigen ให้ผลบวกที่การเจือจางสุดท้าย 1: 4,000 หรือความเข้มข้น 0.5  $\mu\text{g/ml}$

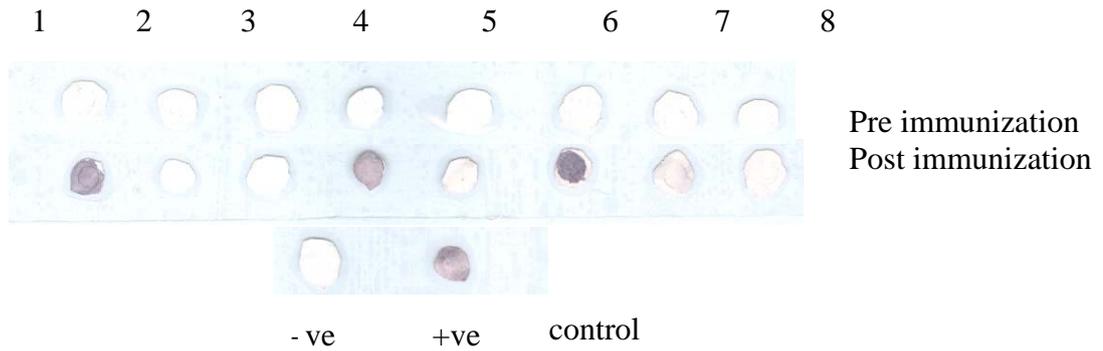
นั่นคือซีรัมจากหนูทดลองทั้ง 8 ตัวก่อนการ immunization ไม่มี แอนติบอดี ต่อ H5N1 HA antigen ส่วนซีรัมจากเลือดหนูทดลองทั้ง 8 ตัวหลังการ immunization มี แอนติบอดี ต่อ H5N1 HA antigen

เนื่องจากการทำ immunization หนูทดลอง 8 ตัวแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ หมายเลข 1 ถึง 4 คือ กลุ่มควบคุมที่ฉีด PBS หมายเลข 5 ถึง 8 คือกลุ่มทดลองที่ฉีด H5N1HA antigen

ดังนั้นจากผลการทดสอบ HAI สรุปได้ว่า 50% ของซีรัมจากหนูทดลองคือ หมายเลข 6 และ 8 ที่ผ่านการ immunization ด้วย H5N1 HA antigen มี antibody titer เท่ากับ 1: 8 ส่วนอีก 50% คือหมายเลข 5และ 7 มี antibody titer เท่ากับ 1: 4

สำหรับในกลุ่มควบคุมที่ฉีด PBS พบว่า 25% ของซีรัมจากหนูทดลองคือ หมายเลข 1 มี antibody titer เท่ากับ 1: 8 ส่วนอีก 75% คือหมายเลข 2 3 และ 4 มี antibody titer เท่ากับ 1: 4 สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจากหนูทดลองติดเชื้อใช้หวัดในห้องปฏิบัติการ

ทั้งนี้ผลจากการทำ dot blot ยืนยันผลการทดสอบ HAI ซึ่งทำโดยการใช้ H5N1 HA antigen ปริมาณ 2  $\mu\text{g}$  จดลงไปบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ที่ให้แห้งแล้วบ่มด้วยสารละลาย 5% skim milk เพื่อป้องกัน nonspecific binding นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยสารละลาย PBS-0.5%Tween (PBST) 3 ครั้ง ครึ่งละ 10 นาทีจึงนำไปบ่มใน primary antibody คือซีรัมจากหนูทดลองทั้งก่อนและหลังการ immunization ที่การเจือจาง 1:10 นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างด้วยสารละลาย PBS-Tween 3 ครั้ง นานครึ่งละ 10 นาที จึงบ่มต่อใน secondary antibody คือ Antimouse IgG ในสารละลาย 1% BSA –PBST นาน 1 ชั่วโมง ที่การเจือจาง 1:5,000 แล้วล้างด้วยสารละลาย PBST 3 ครั้ง จึงย้อมด้วยชุดทดสอบ Alkaline phosphatase conjugate substrate นาน 20 นาที โดยมี positive control คือ ใช้ monoclonal antibody ต่อ H5N1 HA antigen ที่ความเข้มข้น 1  $\mu\text{g/ml}$  แทนซีรัมจากหนูทดลอง ส่วน negative control ใช้ PBS แทน H5N1 HA antigen และใช้ monoclonal antibody ต่อ H5N1 HA antigen ที่ความเข้มข้น 1  $\mu\text{g/ml}$  แทนซีรัมจากหนูทดลอง ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 19



รูปที่ 19 ผลการทำ dot blot หมายเลข 1-8 คือใช้ซีรัมจากหนูทดลอง 8 ตัวก่อนและหลัง immunization เป็น primary antibody

จากรูปที่ 19 แสดงให้เห็นว่าซีรัมจากหนูทดลองทั้ง 8 ตัวก่อนการ immunization ไม่มีแอนติบอดีต่อ H5N1 HA antigen ส่วนซีรัมจากหนูทดลองหลังการ immunization หมายเลข 1 4 และ 6 มีแอนติบอดีต่อ H5N1 HA antigen ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบ HAI ข้างต้น

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. สามารถผลิตรีคอมบีแนนต์ HA โปรตีนที่บริสุทธิ์จากระบบของการใช้เซลล์แมลงและBaculovirus expression system ได้เท่ากับ 228.5 ไมโครกรัมต่อลิตร
2. รีคอมบีแนนต์ HA โปรตีนที่ผลิตได้มีคุณสมบัติกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูทดลองได้โดยซีรัมจากหนูทดลองหลังการ immunization มีแอนติบอดีต่อ H5N1 HA antigen
3. รีคอมบีแนนต์ HA โปรตีนที่ผลิตได้จากเซลล์แมลงนี้มีคุณสมบัติที่สามารถนำไปศึกษาต่อในการผลิตวัคซีนได้

(1) งานตามโครงการที่จะทำต่อไป (ระบุจำนวนเดือน)

ทำงานเสร็จตามแผนที่วางไว้

วัตถุประสงค์	แผนงานวิจัย	เดือนที่												ชื่อนักวิจัย ที่รับผิดชอบ		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1) การผลิต recombinant HA protein จากเซลล์แมลง ในระดับขวดทดลอง	นำ recombinant baculovirus ไป infect เข้าสู่เซลล์แมลง ( $1 \times 10^6$ cells/ml) ด้วย ไวรัส MOI 1	←	→													เพ็ญจันทร์
2) สกัด recombinant HA protein	ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ในการแยกไวรัสด้วยวิธีโครมาโตกราฟี	←	→													กนกวรรณ แสงชัย
3) ศึกษาคุณสมบัติของ recombinant HA protein	ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี และคุณสมบัติทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunogenicity)					←	→									กนกวรรณ พีระ
4) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อขยายขนาดการผลิต recombinant HA protein	การผลิต recombinant HA protein ในถังหมัก ขนาด 2.5 ลิตร	←	→													ไวรุจน์ เพ็ญจันทร์
5) การรวบรวม ผลงานวิจัยเพื่อเขียน รายงาน	สรุปและรวบรวม ผลงานวิจัย												↔	→		เพ็ญจันทร์ กนกวรรณ

(2) คำชี้แจงเกี่ยวกับอุปสรรคหรือปัญหา (ถ้ามี)

โครงการได้ขอขยายเวลาเนื่องจาก

1. ปัญหาการจัดการเวลาไม่ดี
2. ปัญหาน้ำท่วมมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ซึ่งเป็นสถานที่สำหรับการทดสอบโปรตีนในสัตว์ทดลองในส่วนสุดท้ายของโครงการ

## เอกสารอ้างอิง

1. <http://www.cdc.gov/flu/avian/gen-info/pandemics.html>
2. Fields Virology, 4<sup>th</sup> ed, Knipe & Howley eds, Lippincott, Williams & Wilkins, 2001, Fig. 47-2.
3. Medical Microbiology (2002) 4<sup>th</sup> ed., Murray, Rosenthal, Kobayashi & Pfaller, Mosby Inc.,
4. Lamb, R.A., and Krug, R.M.(1996) *Orthomyxoviridae*: The viruses and their replication. In “ Fields virology” (B.N. Fields, D.M. Knipe and P.M. Howley, Eds), pp. 1353-1395, Lippincot-Raven, Philadelphia.
5. Ungchusak K, Auewarakul P, Dowell SF, Kitphati R, Auwanit W, Puthavathana P, Uprasertkul M, Boonnak K, Pittayawonganon C, Cox NJ, Zaki SR, Thawatsupha P, Chittaganpitch M, Khontong R, Simmerman JM, Chunsutthiwat S (2005) Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). N. Engl. J. Med., 352, 333-340.
6. Chotpitayasunondh, T., Ungchusak, K., Hanshaoworakul, W., Chunsuthiwat, S., Sawanpanyalert, P., Kijphati, R., Lochindarat, S., Srisan, P., Suwan, P., Osotthanakorn, Y., Anantasetagoon, T., Kanjanawasri, S., Tanupattarachai, S., Weerakul, J., Chaiwirattana, R., Maneerattanaporn, M., Poolsavathitkool, R., Chokephaibulkit, K., Apisarnthanarak, A. and Dowell, S.F. (2005) Human diseases from influenza (H5N1), Thailand. Emerg. Infect. Dis., 11, 201-209.
7. Hatta, M., Gao, P., Halfmann, P. And Kawaoka Y. (2001), Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. Science, 293, 1840-1842.
8. Shinya, K., Hamm, S., Hatta, M., Ito, H., Ito, T. and Kawaoka, Y. (2004) PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice. Virology, 320, 268-266.
9. Seo, H., Hoffmann. E. E. and Webster, R.G. (2002) Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine response. Nat. Med., 8, 950-4.
10. Cheung, C.Y., Pon, L.L., Lau, A.S., Luk, W., Lau, Y.L., Shortridge, K.F., Gordon, S., Guan, Y. and Peiris, J.S. (2002) Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? Lancet., 7, 360(9348),1831-1837.
11. Horimoto, T., Fukuda, N., Iwatsuki-Horimoto, K., Guan, Y., Lim, W., Peiris, M., Sugii, S., Odagiri, T., Tashiro, M. and Kawaoka, Y. (2004) Antigenic differences between H5N1 human influenza viruses isolated in 1997 and 2003. J Vet Med Sci., 66(3), 303-305.
12. Govorkova, E.A., Regh, J. E., Krauss, S., Yen, H.L., Guan, Y., Peiris, M., Nguyen, T.D., Hanh, T.H., Puthavathana, P., Long, H.T., Buranathai, C., Lim, W., Webster, R.G. and

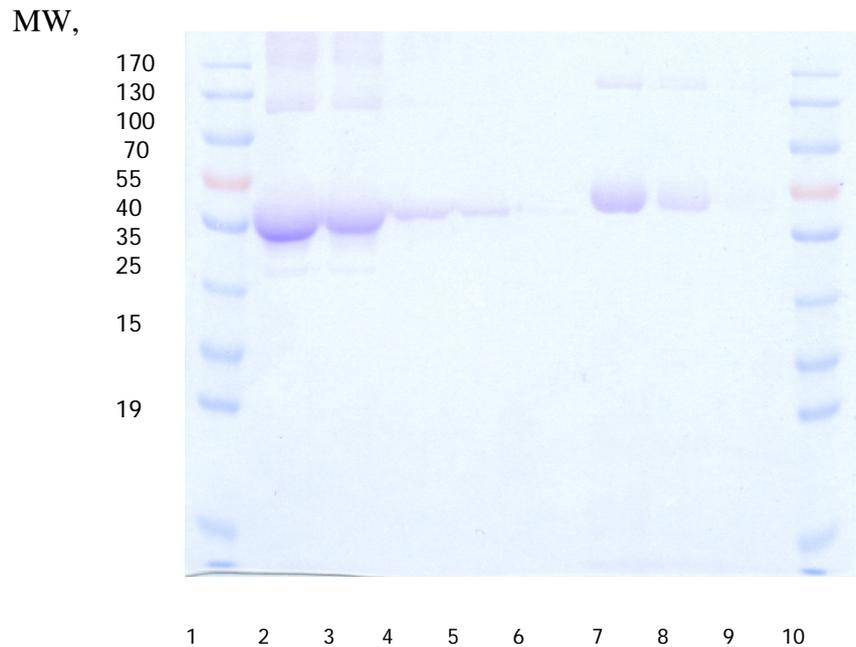
- Hoffmann, E. (2005) Lethality to ferrets of H5N1 influenza viruses isolated from humans and poultry in 2004. *J. Virol.*, 79(4), 2191-2198.
13. Wood, J.M. and Williams, M.S. (1998) History of inactivated influenza vaccines. In K.G. Nicholson, R.G. Webster and A.J. Hay (eds.), *Textbook of influenza*. Blackwell Science Ltd., Oxford, UK, pp.317-323.
  14. Stohr, K. (2003) The global agenda on influenza surveillance and control. *Vaccine*, 21, 1744-1748.
  15. Treanor, J.J., Wilkinson, B.E., Maseoud, F., Hu-Primmer, J., Battaglia, R., O'Brien, D., Wolff, M., Rabinovich, G., Blackwelder, W., Katz, J.M. (2001) Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin vaccine for H5 influenza in humans. *Vaccine*, 19, 1732-1737.
  16. Nicholson, K.G., Colegate, A.E., Podda, A., Stephenson, I., Wood, J., Ypma, E., Zambon, M.C. (2001) Safety and antigenicity of non-adjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a randomised trial of two potential vaccines against H5N1 influenza. *Lancet*, 357, 1937-1943.
  17. Stephenson, I., Bugarini, R., Nicholson, K.G., Podda, A., Wood, J.M., Zambon, M.C. and Katz, J.M. (2005) Cross-reactivity to highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses after vaccination with nonadjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a potential priming strategy. *J. Infect. Dis.*, 191(8):1210-1215.
  18. Webby, R.J., Perez, D.R., Coleman, J.S., Guan, Y., Knight, J.H., Govorkova, E.A., McClain-Moss, L.R., Peiris, J.S., Rehg, J.E., Tuomanen, E.I. and Webster, R.G. (2004) Responsiveness to a pandemic alert: use of reverse genetics for rapid development of influenza vaccines. *Lancet*, 363(9415):1099-103.
  19. Altman, L.C. Avian flu drug works in first tests. *New York Time*. August 7, 2005.
  20. Belshe, R.B., Gruber, W.C., Mendelman, P.M., Cho, I., Reisinger, K., Block, S.L., Wittes, J., Iacuzio, D., Piedra, P., Treanor, J., King, J., Kotloff, K., Bernstein, D.I., Hayden, F.G., Zangwill, K., Yan, L. and Wolff, M. (2000) Efficacy of vaccination with live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine against a variant (A/Sydney) not contained in the vaccine. *J Pediatr.*, 136(2):168-175.
  21. <http://www.proteinsciences.com/vaccines.html>
  22. Galarza JM., Latham T. and Cupo A. (2005) Virus-like particle vaccine conferred complete protection against a lethal influenza virus challenge. *Virol Immunol.*, 18(2): 365-372.

## ภาคผนวก

### วิธีหาปริมาณรีคอมบิแนนต์ HA protein

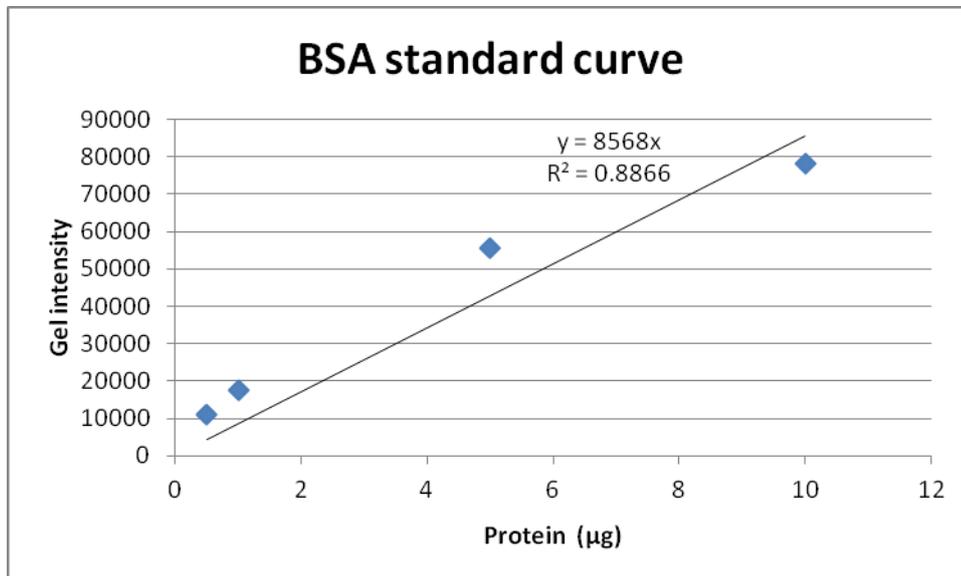
สำหรับปริมาณ HA ที่ได้ คำนวณโดยเทียบจากโปรตีน Bovine serum albumin (BSA) ที่ทราบปริมาณจาก SDS PAGE gel intensity โดยโปรแกรม Gene Tool ดังนี้

1. วิเคราะห์โปรตีน recombinant H5N1 HA ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ด้วย 10% SDS PAGE เทียบกับโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ 5 ความเข้มข้น คือ 10, 5, 1, 0.5 และ 0.1  $\mu\text{g}$  ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีน HA ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ด้วย 10% SDS PAGE ย้อมสี coomassie เทียบกับโปรตีนมาตรฐาน BSA ; เลขที่ 1 และ 10 คือ โปรตีน marker ที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล เลขที่ 2 คือ โปรตีน BSA 10  $\mu\text{g}$  เลขที่ 3 คือ โปรตีน BSA 5  $\mu\text{g}$  เลขที่ 4 คือ โปรตีน BSA 1  $\mu\text{g}$  เลขที่ 5 คือ โปรตีน BSA 0.5  $\mu\text{g}$  เลขที่ 6 คือ โปรตีน BSA 0.1  $\mu\text{g}$  เลขที่ 7 และ 8 คือโปรตีน recombinant HA ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์จากคอลัมน์ CHT hydroxyapatite flow และ wash ตามลำดับ

2. นำภาพ gel ที่ได้ไปวิเคราะห์ความเข้มของแต่ละ band (gel intensity) ด้วยโปรแกรม Gene Tool แล้วนำไปสร้างกราฟมาตรฐาน ดังรูปที่ 2



3. คำนวณหาปริมาณ HA จากกราฟมาตรฐาน BSA ได้ผลดังตารางที่ 1

Sample	Gel intensity	Protein (µg/well)	Protein (µg/ul)	Volume (µl)	Total HA amount (µg)
CHT -flow	37944.6	4.4	0.3	460	135.8
จ CHT-wash	13542.3	1.6	0.1	880	92.7
ก				Total	228.5

ตารางที่ 1 สรุปได้ว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง sf9 ปริมาตร 1 ลิตร เมื่อผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีทางคอลัมน์โครมาโตกราฟีแล้วจะได้โปรตีน recombinant H5N1 HA ปริมาณ 228.5 ไมโครกรัม/ลิตร

ค.ส่วนประกอบตอนท้าย

**รายนามคณะผู้วิจัย**

**หัวหน้าโครงการ**

ชื่อ นางเพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง  
ตำแหน่ง นักวิจัย  
หน่วยงานต้นสังกัด สถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ  
สถานที่ติดต่อ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี  
49 เทียนทะเล25 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน  
กรุงเทพฯ 10150  
โทรศัพท์ 02 470-7498  
โทรสาร 02 452-3455  
อีเมล [phenjun@pdti.kmutt.ac.th](mailto:phenjun@pdti.kmutt.ac.th)  
ความรับผิดชอบต่อโครงการ การขยายขนาดการผลิตในถังหมัก  
คิดเป็น 30% ของงานทั้งหมด

**ผู้ร่วมงานวิจัย**

1. ชื่อ นางสาวกนกวรรณ พุ่มพุทรา  
ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์  
คุณวุฒิ Ph.D (Biochemistry)  
ความชำนาญ/ความสนใจพิเศษ molecular biology of virus, cell culture technology,  
protein purification  
ที่ทำงาน คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี  
49 เทียนทะเล25 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150  
โทรศัพท์ 02-470-7500  
โทรสาร 02-452-3455  
อีเมล [kanokwam.poo@kmutt.ac.th](mailto:kanokwam.poo@kmutt.ac.th)  
ความรับผิดชอบต่อโครงการ การผลิต Recombinant HA baculovirus การแยกและทำ  
บริสุทธิ์ recombinant protein  
คิดเป็น 30% ของงานทั้งหมด

2. ชื่อ นายแสงชัย เอกประทุมชัย  
ตำแหน่ง อาจารย์  
คุณวุฒิ Ph.D (Chemical engineering)  
ความชำนาญ/ความสนใจพิเศษ การผลิตไวรัส และกระบวนการ downstream process สำหรับ  
ไวรัส  
สถานที่ติดต่อ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี  
83 หมู่ 8 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

โทรศัพท์ 02-470-7501  
โทรสาร 02-452-3455  
อีเมล saengchai.ake@kmutt.ac.th  
ความรับผิดชอบต่อโครงการ การผลิตไวรัส การเพิ่มปริมาณและการทำไวรัสบริสุทธิ์ คิดเป็น 25% ของงานทั้งหมด

3. ชื่อ นายไวรุจน์ เดชมหัทกุล  
ตำแหน่ง ผู้ช่วยนักวิจัย  
คุณวุฒิ M.Sc. (food Technology), M.Sc. (Chemical Engineering)  
ความชำนาญ/ความสนใจพิเศษ Product Development และ Bioprocess Engineering  
ที่ทำงาน หน่วยปฏิบัติการวิจัยและพัฒนาวิศวกรรมชีวเคมีและโรงงาน  
ต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี  
83 หมู่ 8 แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

โทรศัพท์ 02-470-7499  
โทรสาร 02-452-3455  
ความรับผิดชอบต่อโครงการ การเตรียมเซลล์และการผลิตโปรตีนในถังหมัก 2.5 ลิตร คิดเป็น 10% ของงานทั้งหมด

#### 4. นายพีระ อารีศรีสม

ตำแหน่ง อาจารย์  
คุณวุฒิ วท.บ.(เทคนิคการสัตวแพทย์) วท.ม.(พยาธิชีววิทยา)  
ความชำนาญ/ความสนใจพิเศษ ปรีติวิทยา และพยาธิคลินิกทางสัตวแพทย์  
ที่ทำงาน คณะเทคนิคการสัตวแพทย์  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร  
กรุงเทพฯ 10900

โทรศัพท์ 0-2579-8574-5 โทรศัพท์ภายใน 1043-6 ต่อ 8310  
โทรสาร 0-2579-8571  
อีเมล cvtpra@ku.ac.th  
ความรับผิดชอบต่อโครงการ การดูแลสัตว์ทดลอง การฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูและการเตรียม  
ซีรัมเพื่อการทดสอบทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา  
คิดเป็น 5% ของงานทั้งหมด