

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแคปซิดโปรตีนของ hepatopancreatic parvovirus

ปริญญานิพนธ์

ของ

ชุตินา ศรีสุข

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

พฤษภาคม 2551

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแคปซิดโปรตีนของ hepatopancreatic parvovirus

ปริญญานิพนธ์

ของ

ชุตินา ศรีสุข

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

พฤษภาคม 2551

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแคปซิดโปรตีนของ hepatopancreatic parvovirus

บทคัดย่อ
ของ
ชุตีมา ศรีสุข

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
พฤษภาคม 2551

ชุตติมา ศรีสุข. (2551). การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแคปซิดโปรตีนของ *hepatopancreatic parvovirus*. ปริญญาโท วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ:บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิราษฎร์, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิวพร ลงยันต์.

งานวิจัยนี้ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจการติดเชื้อ *hepatopancreatic parvovirus* (HPV) ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) โดยทำการเพิ่มจำนวนยีนที่ควบคุมการผลิตแคปซิดโปรตีนของเชื้อ HPV ส่วนที่เป็นรหัสทางด้านปลาย N (HPVN) ขนาด 873 คู่เบส และส่วนที่เป็นรหัสทางด้านปลาย C (HPVC) ขนาด 806 คู่เบส จากนั้นจึงโคลนขึ้น PCR เข้าสู่พลาสมิด pGEX-6P-1 และนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 หลังจากกระตุ้นให้ผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน glutathione-S-transferase (GST) tagged HPVN และ GST tagged HPVC ด้วย 1 mM IPTG รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนทั้งสองชนิดที่ผลิตได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 57.2 และ 56.7 กิโลดาลตัน ตามลำดับ เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์พบว่าโปรตีนที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง เมื่อนำไปใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูขาว พบว่าสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีได้ 6 โคลน ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดี 4 โคลน สามารถจับกับโปรตีน HPVN และโมโนโคลนอลแอนติบอดี 2 โคลน สามารถจับกับโปรตีน HPVC ด้วยวิธี dot blotting และ Western blotting นอกจากนี้สามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน HPVN มาใช้ตรวจหาการติดเชื้อในเนื้อเยื่อตับกุ้งโดยวิธี immunohistochemistry ได้

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST HEPATOPANCREATIC PARVOVIRUS
CAPSID PROTEIN

AN ABSTRACT
BY
CHUTIMA SRISUK

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Science Degree of Biotechnology
at Srinakharinwirot University
May 2008

Chutima Srisuk. (2008). *Production of monoclonal antibody against hepatopancreatic parvovirus capsid protein*. Master thesis, M.Sc. (Biotechnology). Bangkok : Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assist.Prof.Dr. Parin Chaivisuthangkura, Assist.Prof.Dr. Siwaporn Longyant.

The objective of this study is to produce monoclonal antibodies that can be used to detect hepatopancreatic parvovirus (HPV) in *Penaeus monodon*. Two parts of capsid protein gene, HPV_N and HPV_C were amplified as 873 bp and 806 bp, respectively. Each PCR product was cloned into pGEX-6P-1 expression vector and transformed into *E. coli* strain BL21. After induction with 1 mM IPTG, the glutathione-S-transferase (GST) tagged HPV_N and GST tagged HPV_C proteins with molecular masses of 57.2 and 56.7 kDa were obtained. The recombinant proteins were purified and used for immunization into Swiss mice for monoclonal antibody production. Six hybridoma clones producing antibodies specific to HPV were obtained. Four hybridoma clones were specific to HPV_N protein and two hybridoma clones were specific to HPV_C protein as determined by dot blot and Western blot assays. In addition, monoclonal antibodies specific to HPV_N can be used to detect HPV infection in hepatopancreas tissues by immunohistochemistry.

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแคปซิดโปรตีนของ hepatopancreatic parvovirus
ของ
ชุตินา ศรีสุข

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณะบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญสิริ จีระเดชากุล)
วันที่ เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2551

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

..... ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร)

..... ประธาน
(ดร. นุจรี สุวรรณมังกุล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย
จาก
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดีเป็นเพราะผู้วิจัยได้รับคำแนะนำอย่างดียิ่งจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร ประธานกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์ กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล สิทธิกรกุล และ รองศาสตราจารย์ ดร. วีระวรรณ สิทธิกรกุล ผู้คอยตักเตือน สั่งสอน และแนะนำทั้งในด้านวิชาการ ความรู้ และจริยธรรมประกอบการทำปริญญานิพนธ์ที่สมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยุวดี นาคะผดุงรัตน์ อาจารย์ ดร. ประวิติ อังประภาพรชัย ผู้ซึ่งให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ ในการปฏิบัติงานวิจัยทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. นุจรี สุวรรณมังกุล ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ และช่วยแก้ไขปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์และเป็นที่ยอมรับในเชิงวิชาการมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัจนริยา รังษิรุจิ และ คณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษา คุณสมบัติ รักประทานพร ผู้ช่วยนักวิจัยจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ให้ความช่วยเหลือคำแนะนำต่างๆ ในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้ข้าพเจ้าได้ใช้ตลอดระยะเวลาของการทำปริญญานิพนธ์ ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ได้ให้เงินทุนอุดหนุนการศึกษาและการวิจัยครั้งนี้

ขอบคุณ คุณกัลยา ชัยสิทธิตระกูล คุณวารุณี หะยีมะสาและ คุณชลินันท์ เพ็งสุข และพี่ น้องในห้องปฏิบัติการโมโนโคลนอลแอนติบอดี และห้องปฏิบัติการอนุชีววิทยา ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และเพื่อนๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจมาโดยตลอด

ท้ายที่สุดนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณคุณบิดา มารดา ที่ให้การสนับสนุน รวมทั้งเป็นกำลังใจตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาและวิจัยและขอเอาผลประโยชน์อันเกิดจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ทั้งหมดมอบเป็นกุศลแก่ หนูทวดลอง และกุ่มกุลาดำทุกตัว ที่ได้สละชีวิตเพื่อการทำปริญญานิพนธ์ของข้าพเจ้า

ชุตีมา ศรีสุข

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย	4
ขอบเขตของการวิจัย	4
สมมติฐานในการวิจัย	4
ผลที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
3 วิธีดำเนินการวิจัย	23
อุปกรณ์และสารเคมี	23
วิธีดำเนินการทดลอง	26
4 ผลการทดลอง	45
5 สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ	60
บรรณานุกรม	62
ภาคผนวก	67
ประวัติย่อผู้วิจัย	78

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	23
2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	24
3 สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง	25
4 ชนิดของพลาสติกที่ใช้ในการทดลอง	25
5 ส่วนผสมของการทำ PCR เพื่อสังเคราะห์ส่วน HPVn	28
6 ส่วนผสมของการทำ ligation ของผลผลิต PCR กับ pCR® Blunt vector	29
7 ส่วนผสมของการตัดผลผลิต PCR ที่โคลนอยู่ใน pCR® Blunt vector ด้วย <i>Sall</i> และ <i>NotI</i>	33
8 ส่วนผสมของการตัดชิ้นส่วน HPVn หรือ HPVc ที่โคลนอยู่ใน pCR® Blunt vector ด้วย <i>Sall</i> และ <i>NotI</i>	34
9 ส่วนผสมของการทำ ligation ของ HPVn หรือ HPVc กับ pGEX-6P-1 expression vector	35
10 โคลนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVn และ HPVc, class, ความจำเพาะและความไวของการตรวจหาแอนติเจนของ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ทดสอบโดยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry	54

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 กุ้งกุลาดำ.....	6
2 ลักษณะของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ HPV	8
3 ลักษณะของ hepatopancreatic tubule epithelial cells ของกุ้งกุลาดำ ในประเทศไทยที่ติดเชื้อ HPV	9
4 โครงสร้างและองค์ประกอบจีโนมของ HPV	10
5 ลำดับกรดอะมิโนของแคปซิดโปรตีนบางส่วนของ HPV ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทียบกับ SWISSPROT database	17
6 ลำดับเบสและกรดอะมิโนของโปรตีน HPVn	19
7 ลำดับเบสและกรดอะมิโนของโปรตีน HPVc	20
8 โครงสร้างของ pCR [®] Blunt plasmid (Invitrogen)	31
9 โครงสร้างของ pGEX-6P-1 expression Vector (Amersham)	36
10 ส่วนผสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแคปซิดโปรตีนของ HPV ที่ใช้ในการตรวจสอบอิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้	42
11 การเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ	43
12 การเติม Rabbit anti isotype antibodies แต่ละชนิด.....	44
13 ผลผลิต PCR ของ HPVn และ HPVc	46
14 การวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCR Blunt โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Sall และ NotI	47
15 การวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1 โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Sall และ NotI	48
16 การตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน HPVn และ HPVc	50
17 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีชนิดต่างๆ	52
18 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ HPV ด้วยวิธี dot blotting	53
19 การตรวจการติดเชื้อ HPV ภายใน hepatopancreatic tubule epithelial cells ของกุ้ง กุลาดำด้วยวิธี immunohistochemistry	55

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
20 การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting	56
21 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบอีพิโทปของแอนติเจนที่จับ โดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ	58
22 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ในการจับกับ รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVn และ HPVc ด้วยวิธี dot blotting.....	59

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (black tiger shrimp : *Penaeus monodon*) เป็นอุตสาหกรรมที่ทำรายได้ให้กับประเทศผู้ส่งออกกุ้งกุลาดำเป็นอย่างมากเนื่องจากเป็นธุรกิจที่ให้ผลตอบแทนสูงในช่วงสิบกว่าปีที่ผ่านมาได้มีการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นจำนวนมากในประเทศต่างๆ ของทวีปเอเชีย เช่น อินเดีย อินโดนีเซีย เวียดนาม ญี่ปุ่น จีน ไต้หวัน และประเทศไทย สำหรับประเทศไทยเริ่มทำการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบพัฒนาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2529 โดยอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำได้ขยายตัวออกไปอย่างต่อเนื่องและรวดเร็วตามพื้นที่จังหวัดต่างๆ ที่ติดต่อกับชายทะเล (สิริทุกข์วินาศ; และ ชุตินา ชมวิสัย. 2545: ออนไลน์) กุ้งกุลาดำมีบทบาทสำคัญต่อการสร้างรายได้ นำเงินตราเข้าประเทศไม่ต่ำกว่า 50,000 ล้านบาทต่อปี และยังมีส่วนในการจ้างแรงงาน ทำให้เศรษฐกิจโดยรวมของประเทศดีขึ้น อย่างไรก็ตามอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำนั้นประสบปัญหาและอุปสรรคต่างๆ เช่น ปัญหามลพิษและความเสื่อมโทรมของสิ่งแวดล้อม การจัดการฟาร์ม ปัญหาทางการค้าและการตลาด และปัญหาที่เกิดจากการระบาดของโรคติดเชื้อในกุ้งกุลาดำ (Flegel; Fegan; & Sriurairatana. 1995: 65–79) ซึ่งเป็นสาเหตุหลักส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรม การเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก ได้แก่ โรคติดเชื้อในกุ้งที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส แบคทีเรีย รา โปรโตซัว และพยาธิ (Lightner; & Redman. 1998: 201–220) การติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียนั้นสร้างความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทั้งในประเทศไทยและประเทศอื่นๆ ในแถบเอเชียอย่างรุนแรง (Flegel; et al. 1992: 57–112) เชื้อไวรัสสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้ง ได้แก่ (1) ไวรัสหัวเหลือง (yellow head virus; YHV) (2) ไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus; WSSV) (3) ไวรัสเฮปาทอแพติกพาร์วไวรัส (hepatopancreatic parvovirus; HPV) (4) ไวรัสเอ็มบีวี (monodon baculovirus; MBV) (5) ไวรัสโรคทอรา (Taura syndrome virus; TSV) และ (6) ไวรัสไอเอชเอชเอ็นวี (infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus; IHNV) (Loh; et al. 1997: 263–312) สำหรับไวรัสที่เป็นปัญหาในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทย ได้แก่ WSSV, MBV, HPV และ YHV

ไวรัสเฮปาทอแพติกพาร์วไวรัส (HPV) หรือ hepatopancreatic parvovirus เป็นเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคกุ้งแคระ โดยกุ้งที่เป็นโรคจะเจริญเติบโตช้า มีขนาดเล็ก และอวัยวะต่างๆ มีขนาดเล็กลง พบ inclusion bodies ภายในนิวเคลียสของเซลล์ตับทำให้นิวเคลียสของเซลล์ตับมีขนาดใหญ่ขึ้นและเซลล์ตับตาย (Lightner; & Redman. 1998: 201–220) ส่งผลให้เกษตรกรได้ผลผลิตของกุ้งน้อยลง ไม่สามารถจับไปขายได้ จากความเสียหายที่เกิดขึ้นและลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาที่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อมีการติดเชื้อไวรัสและสิ่งที่สำคัญคือสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ ที่เป็นพาหะที่อยู่ในบ่อกุ้งนั้นเป็นมูลเหตุสำคัญที่

ทำให้ยังคงมีการระบาดของโรคดังกล่าวอยู่ การรักษาโรคที่เกิดจากไวรัสนั้นไม่สามารถทำได้ ดังนั้น หากสามารถตรวจพบและวินิจฉัยโรคได้อย่างรวดเร็วจะเป็นวิธีทางเดียวในการจัดการกับโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส

สำหรับวิธีการตรวจเชื้อ HPV นั้นได้มีการพัฒนาขึ้นมากมายประกอบด้วย การตรวจวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา (Histological examination) (Lightner; et al. 1994: 267-272) การตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy; TEM) (Lightner. 1996) ซึ่งทั้งสองวิธีเป็นวิธีที่เชื่อถือได้แต่ต้องใช้บุคลากรที่มีประสบการณ์สูงและอุปกรณ์ที่มีราคาแพง เทคนิค *in situ* hybridization เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงแต่มีความไวต่ำและต้องการ probe ที่จำเพาะ (Mari; et al. 1995: 129-134) ส่วนการตรวจหาสารพันธุกรรม (nucleic acid) ของไวรัส โดยวิธี Polymerase chain reactions (PCR) เป็นวิธีที่มีความไวสูงสามารถตรวจพบไวรัสแม้มีปริมาณน้อยมากในการติดเชื้อระยะแรก และช่วยลดเวลาในการตรวจวินิจฉัยแบบเดิม (Sukhumsirichart; et al. 1999: 1-10; Pantoja; & Lightner. 2000: 177-182) แต่การวิเคราะห์ผลต้องใช้ agarose gel electrophoresis จึงไม่เหมาะในการนำไปตรวจเชื้อในฟาร์มกึ่ง เนื่องจากต้องใช้เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าและต้องเสียเวลาในการเตรียมเจล นอกจากนี้วิธี PCR-ELISA เป็นเทคนิคที่ถูกต้องแม่นยำ ไม่จำเป็นต้องใช้ ethidium bromide ซึ่งจัดเป็นสารก่อมะเร็ง (Sukhumsirichart; et al. 2002: 409-413) เทคนิคนี้มีความไวและความจำเพาะสูงแต่ต้องใช้บุคลากรที่มีความชำนาญเช่นกัน

เทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันเกี่ยวกับปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี เป็นปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะสูงมาก ดังนั้นจึงได้มีการนำเอาโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody) มาใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้านโดยอาศัยปฏิกิริยาที่จำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีนี้ (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548) ได้มีรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี มาใช้สำหรับตรวจเชื้อ HPV โดยใช้เชื้อ HPV ที่แยกจากกึ่งกุลาดำเป็นแอนติเจน ซึ่งแอนติบอดีที่ผลิตได้เหล่านี้สามารถใช้ในการตรวจเชื้อ HPV ด้วยวิธี dot blotting, Western blotting และตรวจเนื้อเยื่อโดยวิธี immunohistochemistry (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89) แต่ประสิทธิภาพการใช้งานยังไม่ดีนัก เนื่องจากไม่สามารถจับกับ intranuclear inclusion bodies ได้ทั้งหมด เช่นเดียวกับการทำ *in situ* hybridization ที่ใช้ DNA probe ที่จำเพาะต่อเชื้อ HPV ที่แยกจากกึ่งกุลาดำ (Sukhumsirichart; et al. 1999: 1-10)

จะเห็นว่าเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกันเป็นเทคนิคที่สะดวก ง่ายต่อการใช้งาน ให้ผลการตรวจสอบที่รวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ (Sithigorngul; et al. 2002: 71-76) เกษตรกรสามารถนำไปใช้ได้เองโดยไม่จำเป็นต้องอาศัยความรู้ความชำนาญมาก ทำให้สามารถตรวจเพื่อติดตามการติดเชื้อในระหว่างการเลี้ยงได้ตลอดเวลา อันเป็นการลดความเสียหายของเกษตรกร สำหรับการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยใช้ไวรัสจากกึ่งที่ติดเชื้อตามแบบธรรมชาติเป็นแอนติเจนนั้นมีขั้นตอนในการทำให้ไวรัสบริสุทธิ์หลายขั้นตอนและอาจมีเนื้อเยื่อของปะปนมาด้วยทำให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้อาจจับกับเนื้อเยื่อของกึ่งปกติด้วย จากความรู้

เกี่ยวกับจีโนมของ HPV (Sukhumsirichart; et al. 2006: 266–277) ทำให้ทราบองค์ประกอบต่างๆ ของสารพันธุกรรมไวรัสและสามารถจำแนกยีนที่ทำหน้าที่ผลิตแคปซิดโปรตีนของไวรัสได้ ซึ่ง แคปซิดโปรตีนเป็นโปรตีนโครงสร้างส่วนนอกสุดของไวรัสเพียงชนิดเดียว (Sukhumsirichart; et al. 2006: 266–277) ดังนั้นการใช้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของไวรัส HPV เป็นแอนติเจนเพื่อใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจึงมีประโยชน์อย่างมากเนื่องจากสามารถผลิตโปรตีนได้ตามต้องการโดยไม่จำเป็นต้องแยกเชื้อไวรัสจากกึ่งที่ติดเชื้อ

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อโคลนยีนแคปซิดโปรตีนและกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ HPV
2. เพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแคปซิดโปรตีนของ HPV
3. เพื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้ตรวจโรคกึ่งแคะในกึ่งกลาดำด้วยวิธี dot blotting,

Western blotting และ immunohistochemistry

ขอบเขตของการวิจัย

1. การเพิ่มจำนวนยีน การโคลนยีนแคปซิดโปรตีน และการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนส่วนปลาย N และปลาย C ใน *Escherichia coli* (*E. coli*)
2. การทำให้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่ได้จากการกระตุ้นการแสดงออกใน *E. coli* มีความบริสุทธิ์
3. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ HPV โดยใช้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่ผลิตได้
4. การคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HPV โดยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry
5. การพิสูจน์คุณสมบัติโดยการตรวจสอบอิพิโทป การจำแนก class และ subclass รวมทั้งการทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

สมมติฐานในการวิจัย

การสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแคปซิดโปรตีนของ HPV อาจทำโดยใช้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่สร้างจากยีนแคปซิดโปรตีนของไวรัสเป็นแอนติเจนกระตุ้นหนูขาว

ผลที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1. สามารถโคลนยีนแคปซิดโปรตีนและกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของเชื้อ HPV ได้
2. ได้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแคปซิดโปรตีนของ HPV
3. สามารถนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาใช้ตรวจโรคกึ่งแคะในกึ่งกลาดำด้วยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กุ้งกุลาดำ

ลักษณะโดยทั่วไป

กุ้งกุลาดำหรือกุ้งมัลล่าย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus monodon* (ภาพประกอบ 1) กุ้งชนิดนี้อยู่ในวงศ์ Penaeidae มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว ในขณะที่ยังมีชีวิตอยู่ลำตัวจะเป็นสีม่วงแดง มีแถบสีน้ำตาลหรือดำพาดขวาง ลำตัวเป็นปล้องๆ โคนขาว่ายน้ำมีแถบสีเหลืองเป็นปล้องๆ เปลือกหุ้มเกลี้ยงไม่มีขน หนวดมีสีดำไม่มีลาย กรักด้านบนมี 7 ถึง 8 ซี่ ด้านล่างมี 3 ซี่ ร่องข้างกรักทั้งสองด้านมีลักษณะแคบและยาวไม่ถึงกรักสิ้นสุดท้าย ขาเดินคู่ที่ 5 ไม่มีระยางค์อันนอก กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในวงศ์ Penaeidae ถิ่นอาศัยของกุ้งกุลาดำได้แก่ น่านน้ำแถบประเทศไต้หวัน ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และที่พบมากได้แก่ ออสเตรเลียและอินเดีย กุ้งชนิดนี้อยู่ในเขตร้อนชอบอาศัยอยู่ในบริเวณน้ำลึก ห่างออกจากฝั่งและชอบพื้นทะเลที่เป็นดินทราย สามารถทนอยู่ในน้ำที่มีอุณหภูมิสูงและความเค็มต่ำ เช่น บริเวณป่าชายเลน (กุ้งกุลาดำ. ม.ม.ป: ออนไลน์)

อนุกรมวิธานของกุ้งกุลาดำ

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacia
Subclass	Malacostraca
Order	Decapoda
Suborder	Dendrobranchiae
Superfamily	Penaeoidea
Family	Penaeidae



ภาพประกอบ 1 กุ้งกุลาดำ
ที่มา : งานวิจัยในเรื่องกุ้งกุลาดำ. (2549). (ออนไลน์)

วงจรชีวิตของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำวางไข่ในทะเล กุ้งที่มีอายุประมาณ 12 ถึง 18 เดือนจะวางไข่ในทะเลลึกที่ระดับน้ำประมาณ 15 ถึง 30 เมตร ใกล้กับพื้นท้องทะเล กุ้งขนาด 70 ถึง 150 กรัม จะวางไข่ครั้งละประมาณ 1,000,000 ถึง 1,200,000 ฟอง ไข่ที่ผสมแล้วขณะที่ปล่อยสู่น้ำทะเลใหม่ๆ จะมีลักษณะกลม และค่อยๆ พัฒนาจนฟักเป็นตัวอ่อนระยะนอเพียส (nauplius) ภายใน 12 ชั่วโมง ระยะนอเพียสมีขนาด 0.3 ถึง 0.33 มิลลิเมตร ยังไม่กินอาหาร ดำรงชีวิตแบบแพลงก์ตอน ประมาณ 2 วัน ระยะนี้จะมีการลอกคราบ 6 ครั้ง สิ้นสุดระยะนอเพียสจะมีขนาดประมาณ 0.6 มิลลิเมตร จากนั้นเจริญเข้าสู่ระยะโปรโตซัวเอีย (protozuea) มีขนาด 1 ถึง 3.3 มิลลิเมตร กินแพลงก์ตอนพืชเป็นอาหาร ลอกคราบ 3 ครั้ง ใช้เวลา 3 ถึง 4 วัน จะเจริญเข้าสู่ระยะไมซิส (mysis) ขนาดประมาณ 3.3 ถึง 5 เซนติเมตร กินแพลงก์ตอนสัตว์เป็นอาหาร ใช้เวลา 3 ถึง 4 วันจะเข้าสู่ระยะโพสลาวา (postlarva) หรือที่นิยมเรียกว่า P1 ระยะนี้จะเรียกตามจำนวนวันที่กุ้งเติบโต เช่น P10 คือกุ้งในระยะนี้อายุ 10 วัน จนวันที่ 20 กุ้งจะมีขนาด 2 ถึง 3 เซนติเมตร จะเข้าสู่ระยะจูเวนไนล์ (juvenile) มีลักษณะต่างๆ สมบูรณ์เหมือนตัวเต็มวัยแต่ไม่สามารถสืบพันธุ์ได้ จนเข้าสู่ระยะเจริญพันธุ์และใช้เวลาประมาณ 10 เดือนจะเป็นตัวเต็มวัย (กุ้งกุลาดำ. ม.ม.ป: ออนไลน์)

โรคที่เกิดขึ้นในกุ้ง

โรคส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นกับกุ้งที่เพาะเลี้ยงแบ่งเป็น 2 ประเภทคือ โรคไม่ติดเชื้อและโรคติดเชื้อ โรคไม่ติดเชื้อที่เกิดขึ้นกับกุ้งมักมีสาเหตุมาจากภาวะแวดล้อมในบ่อเลี้ยงไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิของน้ำ ความเค็ม ปริมาณออกซิเจน ภาวะทางโภชนาการ สารพิษ และความเครียด (Bachere. 2000: 3-11) ส่วนโรคติดเชื่อนั้นเป็นสาเหตุหลักสำคัญซึ่งส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก โรคติดเชื้อในกุ้งที่สำคัญเกิดจากการติดเชื้อไวรัส แบคทีเรีย รา โปรโตซัว และพยาธิ (Lightner; & Redman. 1998: 201–220) ซึ่งการติดเชื้อไวรัสและแบคทีเรียนั้นสร้างความเสียหายแก่อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทั้งในประเทศไทยและประเทศอื่น ๆ ในแถบเอเชียอย่างรุนแรง (Flegel; et al. 1992: 57-112) เชื้อไวรัสสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งได้แก่ (1) ไวรัสหัวเหลือง (yellow head virus; YHV) (2) ไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus; WSSV) (3) ไวรัสเฮปาทิก (hepatopancreatic parvo virus; HPV) (4) ไวรัสเอ็มบีวี (monodon baculovirus; MBV) (5) ไวรัสโรคทอรา (Taura syndrome virus; TSV) และ (6) ไวรัสไอเอชเอชเอ็นวี (infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus; IHNV) (Loh; et al. 1997: 263–312)

โรคกุ้งแคระ

hepatopancreatic parvovirus หรือ ไวรัสเฮปาทิก (HPV) ก่อให้เกิดโรคกุ้งแคระ มีรายงานครั้งแรกในประเทศสิงคโปร์ (Chong; & Loh. 1984: 51-56) แต่ในขณะนั้นยังขาดความรู้เกี่ยวกับการแพร่กระจายของเชื้อ จากข้อมูลเบื้องต้นพบว่าไวรัสสามารถทำให้ตัวอ่อนของกุ้งตาย โดยเฉพาะกุ้งที่มีการติดเชื้ออย่างรุนแรงในระหว่างเดือนแรก (Flegel; Fegan; & Sriurairatana 1995: 65-79) ไวรัสนี้ก่อให้เกิดโรคในกุ้งสกุล penaeid 4 สายพันธุ์ คือ *P. chinensis* จากประเทศจีน , *P. merguensis* จากประเทศสิงคโปร์, *P. monodon* จากประเทศฟิลิปปินส์ และ *P. semisulcatus* จากประเทศคูเวต ต่อมา HPV ได้แพร่กระจายไปหลายประเทศในเอเชีย แอฟริกา ออสเตรเลีย อเมริกาเหนือและอเมริกาใต้ (Paynter; Lightner; & Lester. 1985: 61-64, Lightner. 1996) โดยคาดว่า HPV อาจมีแหล่งกำเนิดจากแถบอินโดแปซิฟิกและแพร่กระจายไปยังประเทศแถบอเมริกา ผ่านทางการส่งออกของกุ้งในเอเชียที่ติดเชื้อและยังมีชีวิตอยู่ (Lightner. 1996) อาการของกุ้งที่ติดเชื้อจะไม่มีสัญญาณภายนอกบ่งบอกชัดเจน (ภาพประกอบ 2) นอกจากตัวของกุ้งจะมีขนาดเล็กลง การกินอาหารลดลง การติดตัวน้อยลง และมีอัตราการเจริญเติบโตช้า การที่กุ้งเจริญเติบโตช้าอาจมีสาเหตุหลายประการ การดูจากลักษณะภายนอกจึงไม่เพียงพอที่จะระบุว่ากุ้งติดเชื้อ (Lightner; & Redman. 1985: 47–53)



ภาพประกอบ 2 ลักษณะของกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ HPV โดยกุ้งจะมีขนาดเล็ก (ภาพขวา)
เมื่อเทียบกับกุ้งปกติ (ภาพซ้าย)

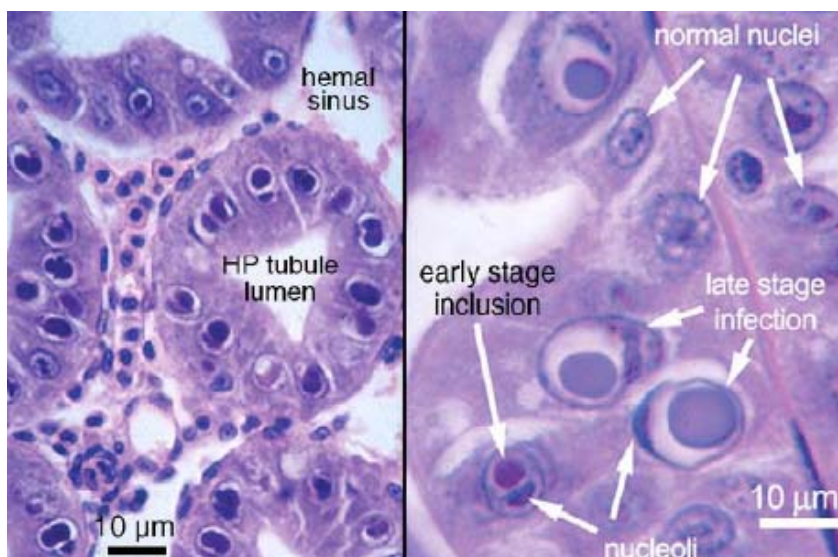
ที่มา : Timothy Flegel. (2006). *Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. Aquaculture. (258):p. 16.*

สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการติดเชื้อ HPV ในกุ้งกุลาดำ เป็นครั้งแรกในปี 1992 (Flegel; et al. 1992: 57–112) ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำเป็นอย่างมาก เนื่องจากการจับกุ้งไปขาย กุ้งที่มีขนาดเล็กจะหลุดรอดออกจากตาข่ายและหากจับไปขายได้กุ้งจะมีน้ำหนักประมาณ 5 กรัมต่อตัวหรือ 200 ตัวต่อกิโลกรัมทำให้เกษตรกรขาดทุน ต่อมาได้มีการศึกษา กุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ HPV ในประเทศไทยและพบว่าความแฉะแกร็นของกุ้งกุลาดำขึ้นกับระดับความรุนแรงในการติดเชื้อ (Flegel; et al. 1999: 197–206)

พยาธิสภาพของกุ้งที่ติดเชื้อ HPV

จากรายงานการศึกษาเชื้อ HPV ในปี 1994 พบว่าเชื้อ HPV อาจมีความแตกต่างกันในกุ้งแต่ละสายพันธุ์ (Lighter; et al. 1994: 267-272) ต่อมาในปี 1996 ไลท์เตอร์ (Lighter. 1996) ได้ทำการตรวจเชื้อ HPV ในตับกุ้งโดยวิธีพยาธิวิทยาและตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่ากุ้งที่ติดเชื้อจะมีลักษณะ basophilic intranuclear inclusion bodies ขนาดใหญ่ภายในนิวเคลียสของ tubule epithelial cells ของเซลล์ตับกุ้ง ทำให้นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ผิดปกติ ฟีเกิล (Flegel. 2006: 1-33) กล่าวว่า ในระยะแรกของการติดเชื้อ inclusion bodies จะติดสี eosinophilic

และในระยะสุดท้ายของการติดเชื้อ inclusion bodies จะติดสี basophilic และ HPV อาจมีขอบเขตการติดเชื้อในอวัยวะที่เจริญมาจาก endoderm (ภาพประกอบ 3)

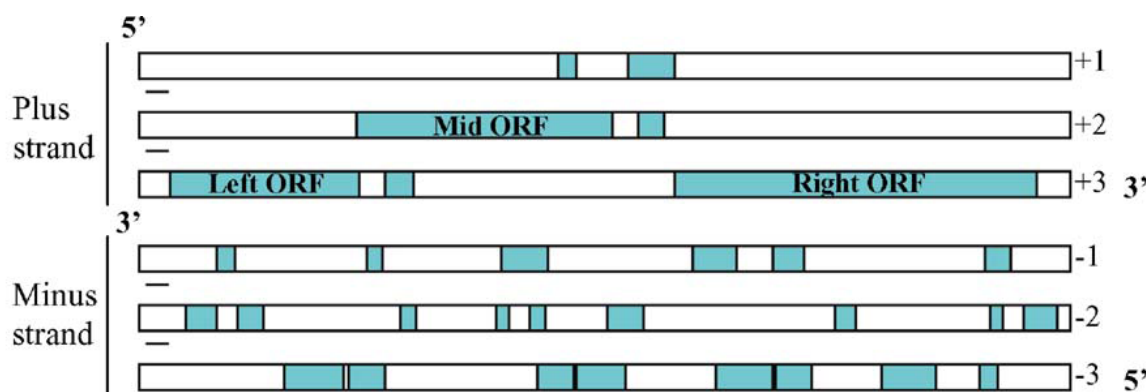


ภาพประกอบ 3 ลักษณะของ hepatopancreatic tubule epithelial cells ของกุ้งกุลาดำในประเทศไทยที่ติดเชื้อ HPV จะเห็นว่าในระยะแรกของการติดเชื้อ inclusion bodies จะติดสี eosinophilic และในระยะสุดท้ายของการติดเชื้อ inclusion bodies จะติดสี basophilic ที่มา : Timothy Flegel. (2006). *Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. Aquaculture. (258):p. 17.*

ลักษณะการเรียงตัวของจีโนมของ HPV

ลักษณะของไวรัส HPV มีรูปร่างเป็น icosahedral ไม่มี envelope เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 22-23 นาโนเมตร มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded DNA; ssDNA) (Lightner; & Redman. 1985: 47-53) จากขนาดและรูปร่างของไวรัสสามารถระบุได้ว่า HPV อยู่ในตระกูล Parvoviridae แต่ขณะนั้นยังไม่ทราบว่าอยู่ใน subfamily ไต (Bonami; et al. 1995 : 813–817) ต่อมาในปี 2006 ได้มีการศึกษาโครงสร้างและองค์ประกอบจีโนมของเชื้อ HPV (Sukhumsirichart; et al. 2006 : 266-277) โดยจัดจำแนกจีโนมของไวรัสที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำในประเทศไทยที่เป็นโรคกุ้งแคระ (HPVmon) พบว่า HPV มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว, สายลบ (minus) มีขนาด 6,321 นิวคลีโอไทด์ จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของจีโนมโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ พบว่า HPV มี 3 open reading frames (ORFs) ตั้งอยู่บนสาย complementary (plus) strand คือ Left ORF (ORF1), Mid ORF (ORF2), และ Right ORF

(ORF3) (ภาพประกอบ 4) ซึ่งอาจเป็นรหัสในการสังเคราะห์กรดอะมิโนขนาด 428, 579, และ 818 ตัว และมีมวลโมเลกุล 50, 68 และ 92 กิโลดาลตัน ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบบริเวณที่ไม่เป็นรหัส (non-coding) 2 บริเวณ ที่ปลายทั้งสองของจีโนม แต่ไม่พบ inverted terminal repeat (ITR) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับลักษณะของไวรัสใน subfamily Densovirinae และ genus Brevidensovirus



ภาพประกอบ 4 โครงสร้างและองค์ประกอบจีโนมของ HPV ทั้งสายลบ (minus) และสายบวก (plus) โดยมี 3 ORFs ตั้งอยู่บนสาย complementary (plus) strand ประกอบด้วย Left ORF (ORF1), Mid ORF (ORF2), และ Right ORF (ORF3)

ที่มา : Wasana Sukhumsirichart; et al. (2006). *Complete nucleotide sequence and genomic organization of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of Penaeus monodon*. *Virology*. (346): p. 270.

จากการเปรียบเทียบโปรตีนที่ผลิตจากแต่ละ ORFs กับโปรตีนใน database พบว่า ORF2 ประกอบด้วย บริเวณที่เป็น replication initiator motif, NTP-binding และ helicase domain ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ nonstructural protein (NS-1) ของ parvoviruses ชนิดอื่นๆ ดังนั้น ORF2 อาจเป็นบริเวณที่สังเคราะห์ NS-1 ใน HPV ส่วนผลผลิตของยีนจาก ORF1 พบว่าไม่ตรงกับโปรตีนใดใน database เลย จึงคาดว่า ORF1 อาจเป็นรหัสในการสังเคราะห์ nonstructural protein-2 (NS-2) ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่ สำหรับ ORF3 พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์แคปซิดโปรตีนของ HPV ที่พบใน *P. chinensis* (HPV_{chin}) ขนาดประมาณ 92 กิโลดาลตัน แต่จากการวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequence) ของ ORF3 พบว่าอาจเกิด proteolytic cleavage ที่บริเวณถัดจาก arginine residue จึงทำให้ได้แคปซิดโปรตีนขนาด 57 กิโลดาลตัน

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ HPV โดยเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่มี การอนุรักษ์ (conserved amino acid sequences) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 119 ตัวของ NTP-binding และ helicase domain พบว่า HPV มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ Brevidensovirus คือ shrimp parvovirus (IHNV) และ mosquito densovirus 2 ชนิดคือ *Aedes aegypti* densovirus (AaeDNV) และ *Aedes albopictus* densovirus (Aa/DNV) อย่างไรก็ตามองค์ประกอบและขนาดของจีโนมของ HPV ยังคงมีความแตกต่าง

จากข้อมูลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) โครงสร้างและองค์ประกอบ ต่างๆ ของจีโนม (genomic structure and composition) และสายวิวัฒนาการ (evolution) พบว่า HPV มีความคล้ายคลึงกับไวรัสในตระกูล Parvoviridae จึงจัดให้ HPV เป็นไวรัสชนิดใหม่ใน

family Parvoviridae

subfamily Densovirinae

และเรียกว่า *P. monodon densovirus* หรือ *PmDNV*

การศึกษาและการตรวจการติดเชื้อ HPV

การศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อ HPV

ในปี 1996 ได้มีการศึกษาการติดเชื้อ HPV แบบ vertical transmission ของกิ้ง *P. chinensis* รุ่นพ่อ-แม่ (parental) ที่ติดเชื้อและเมื่อตรวจหาเชื้อ HPV ในรุ่นลูก (F1) จะพบการติดเชื้อ ด้วยจึงเชื่อว่าการติดเชื้อสามารถเกิดแบบ vertical transmission (Lighter. 1996) ต่อมาในปี 2003 มีรายงานการตรวจเชื้อ HPV จากกิ้งกุลาดำระยะ postlarvae (PL-13, PL-18, PL-19, PL-26) จาก โรงเพาะฟัก 2 แห่งใน Samar และ Iloilo ประเทศฟิลิปปินส์ พบว่าในเดือนสิงหาคม 2001 มีการติดเชื้อของ HPV ร้อยละ 20-100 ของ postlarvae จาก Samar ส่วนกิ้ง postlarvae จาก Iloilo ที่เก็บ ตัวอย่างในเดือนตุลาคมและพฤศจิกายน 2001 มีการติดเชื้อร้อยละ 70-99 จากการทำ wet-mount เนื้อเยื่อตับและย้อมด้วย malachite green และการทดสอบทางพยาธิวิทยา พบ basophilic intranuclear inclusion bodies ขนาดใหญ่ บริเวณปลายท่อของเซลล์ตับ ทำให้เกิดการย้ายที่ของ นิวเคลียส จากการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แสดงให้เห็นว่าเกิด spherical inclusion bodies ขนาด 5-11 ไมโครเมตร เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า inclusion bodies จะทึบแสงอิเล็กตรอน และอนุภาคไวรัสมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 18-22 นาโนเมตร การทดลองนี้ ได้เห็นยวนาให้กิ้งกุลาดำระยะ postlarvae (PL16) ติดเชื้อ HPV โดยให้กิ้งกินกิ้งในระยะ postlarvae ที่ติดเชื้อ หลังจากให้อาหาร 24 ชั่วโมง พบว่าลูกกิ้งติดเชื้อและมีการติดเชื้อประมาณร้อยละ 30 และเมื่อถึงวันที่ 7 พบว่าลูกกิ้งจะติดเชื้อ HPV หมดทั้งบ่อ งานวิจัยนี้จึงเป็นรายงานแรกๆ ที่แสดงให้เห็นว่า กิ้งกุลาดำในระยะ postlarvae สามารถติดเชื้อ HPV แบบ horizontal transmission (Catap; et al. 2003 : 11-17)

การตรวจเชื้อทางพยาธิวิทยาและการย้อมสี

การตรวจเชื้อ HPV มักประสบปัญหาเนื่องจากไม่พบสัญญาณบอโรคที่ชัดเจน (Flegel; et al. 1992: 57–112, Lightner; et al. 1993: 15–23) วิธีที่ใช้ตรวจโรคส่วนใหญ่มักใช้การตรวจวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา การย้อมสี hematoxylin และ eosin โดยใช้เนื้อเยื่อตับกึ่งซึ่งเป็นอวัยวะเป้าหมายของไวรัส นอกจากนี้การตรวจเชื้อ HPV โดยย้อมเซลล์ด้วยสี giemsa เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วกว่าการย้อมสี hematoxylin และ eosin รวมทั้ง *in situ* hybridization เนื่องจากเทคนิคนี้ไม่ต้องเตรียมเนื้อเยื่อและสามารถตรวจการติดเชื้อในฟาร์มได้แต่ยังคงมีความไวต่ำ (Lightner; et al. 1993: 15–23)

วิจิตรา วรรณโฆหาร และคนอื่นๆ (2545) ได้ตรวจหาความชุกของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส HPV ในกึ่งกลาดำระยะวัยอ่อน ในช่วงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2543 ถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2544 โดยวิธีย้อมสีด้วย 0.1% malacrite green พบว่ามีความชุกของโรคนี้ร้อยละ 11.46–93.75

ในปี 2001 ได้มีรายงานการศึกษาลักษณะทางพยาธิวิทยาของกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสพบความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อไวรัส HPV กับอัตราการเจริญเติบโตช้าของกึ่งกลาดำที่เลี้ยงในฟาร์มและพบว่าความรุนแรงจะมากขึ้นถ้ามีการติดเชื้อร่วมกันของ MBV กับ HPV (Flegel; et al. 2001: 48-63)

ต่อมาได้มีการศึกษาทางพยาธิวิทยาของกึ่งกลาดำโดยนำตัวอย่างกึ่งกลาดำ 400 ตัวที่มีขนาดแตกต่างกันและมีลักษณะปกติไม่มีสัญญาณบ่งชี้ว่าเป็นโรคจากฟาร์มเลี้ยงกึ่ง 12 แห่งในประเทศไทย ได้แก่ ฟาร์มในจังหวัดสงขลา จังหวัดราชบุรีและจังหวัดชุมพร โดยเก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนสิงหาคม 1996 ถึงเดือนกันยายน 1998 พบว่ามีการติดเชื้อไวรัส 2 ชนิดคือ HPV และ MBV ในอัตราค่อนข้างสูง การติดเชื้อทั้งสองชนิดนี้มีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตชะงักและกึ่งแคะแกร็น การติดเชื้อไวรัส HPV มีผลต่อกึ่งทำให้กึ่งแคะแกร็น มากกว่าเชื้อไวรัส MBV โดยกึ่งที่ติดเชื้อ HPV จะหยุดการเจริญที่ความยาวประมาณ 6 เซนติเมตรและจากการตรวจการติดเชื้อด้วยวิธี PCR พบว่าร้อยละ 94 ของกึ่งกลาดำที่ตรวจมีการติดเชื้อจากไวรัสชนิดเดียว และร้อยละ 79 เป็นกึ่งที่มีการติดเชื้อไวรัส 2 ชนิด (Flegel; et al. 2004: 55-68)

การตรวจเชื้อโดยวิธี PCR และ hybridization

ในปี 1999 มีรายงานการนำตัวอย่างกึ่งกลาดำจากฟาร์มแห่งหนึ่งทางตอนใต้ของประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างกึ่ง 790 ตัว จากนั้นนำตับกึ่งแช่ในไนโตรเจนเหลว และสุมจับตับกึ่ง 1 ตัว จากทุกๆ 10 ตัว (ทั้งหมด 79 ตัว) แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านและอีกส่วนดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดา ผลการตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดาพบว่า กึ่งติดเชื้อ HPV ร้อยละ 30 และเมื่อยืนยันด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านก็ให้ผลเช่นเดียวกัน จึงทำการแยกเชื้อไวรัสออกจากตับกึ่ง และย้อมด้วย 0.5% sodium phosphotungstate พบว่า อนุภาคไวรัสมีลักษณะเป็น icosahedral

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 22-24 นาโนเมตร ไม่มี envelope และเมื่อสกัดสารพันธุกรรมมาวิเคราะห์ด้วย electrophoresis พบว่า สารพันธุกรรมมี 2 ขนาด คือ แถบเข้มขนาด 5.8 กิโลเบส และแถบจางขนาด 4.2 กิโลเบส โดยแถบขนาด 5.8 กิโลเบส สามารถย่อยสลายได้โดย DNase I และ nuclease S₁ แสดงว่าไวรัสมีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว จากลักษณะรูปร่างและสารพันธุกรรม HPV น่าจะอยู่ใน Family Parvoviridae เมื่อนำ ssDNA ขนาด 5.8 กิโลเบส มาสร้าง genomic DNA library และทำ Southern blot โดยใช้ genomic DNA ของ HPV เป็น probe พบว่าโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 659 คู่เบส มีความไวและความจำเพาะสูง จึงนำไปหาลำดับเบส และออกแบบ primer 121F และ 276R สำหรับทำ PCR ซึ่งผลการทำ PCR พบว่า กุ้งที่ติด HPV จะให้ผลผลิต PCR ขนาด 156 คู่เบส ขณะที่กุ้งปกติและกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV, YHV, ไวรัส nuclear polyhedrosis virus (NPV), *Salmonella*, MBV และ IHNV ให้ผลลบ (Sukhumsirichart; et al 1999: 1-10)

สำหรับการตรวจการติดเชื้อ HPV โดยวิธี DNA probe และ PCR นั้นได้มีผู้พัฒนาวิธีการเหล่านี้สำหรับตรวจเชื้อ HPV จาก *P. chinensis* ในประเทศเกาหลีและพบว่าเป็นวิธีที่รวดเร็วและไม่เป็นอันตราย (Mari; et al. 1995: 129–134) แต่การใช้เทคนิค *in situ* hybridization โดยใช้ probe ที่จำเพาะต่อชิ้นของ HPV สามารถตรวจเชื้อได้แต่ก็ต้องใช้เวลานานในการเตรียมเนื้อเยื่อตัวกุ้ง วิธีวิเคราะห์การติดเชื้อ HPV มักจะใช้วิธีวัดที่ติดเชื้อมาตรวจและทำให้กุ้งที่นำมาตรวจต้องตายต่อมาจึงได้มีการพัฒนาวิธีสำหรับตรวจการติดเชื้อ HPV โดยใช้ PCR มาวิเคราะห์ผลของกุ้งที่ยังมีชีวิตอยู่ โดยเก็บมูลของกุ้ง *P. chinensis* ที่ติดเชื้อมาทำ PCR และใช้ primer 1120F และ 1120R ซึ่งออกแบบจากลำดับดีเอ็นเอของ HPV ที่ทราบข้อมูลแล้ว (โคลนของ HPV ที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.136 กิโลเบส หรือ HPV clone HPV8) ซึ่งจะให้ผลผลิต PCR ขนาด 592 คู่เบส จากผลการทำ PCR มูลของกุ้งพบว่ากุ้งที่ติดเชื้อให้ผลตรงตามที่คาดไว้แต่จะให้ผลลบกับกุ้งปลอดเชื้อ (specific pathogen-free shrimp) และจากการทำ PCR ทดสอบความจำเพาะกับไวรัสชนิดอื่นๆ พบว่าให้ผลลบเช่นกัน นอกจากนี้ยังได้ทำการพิสูจน์ผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นโดยนำผลผลิต PCR มาติดฉลากด้วย digoxigenin (DIG)-11-dUTP และทำ *in situ* hybridization พบว่าสามารถจับกับเนื้อเยื่อตัวกุ้งที่ติดเชื้อ HPV ได้แต่ไม่จับกับกุ้งปลอดเชื้อและกุ้งที่ติดเชื้อ IHNV รวมทั้ง parvovirus ชนิดอื่นๆ ด้วย (Pantoja; & Lightner. 2000: 177–182)

ต่อมาในปี 2001 มีการใช้ primer และ DNA probe (DiagXotics) ที่ออกแบบจากเชื้อ HPV_{chin} ที่ติดในกุ้ง *P. chinensis* มาตรวจกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ HPV_{mon} จากฟาร์ม 50 แห่งในประเทศไทย พบผลผลิต PCR ขนาด 732 คู่เบส ขณะที่เชื้อ HPV_{chin} จะให้ผลผลิต PCR ขนาด 350 คู่เบส และเมื่อใช้ DNA probe มาทำ *in situ* DNA hybridization กับเนื้อเยื่อตัวกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อจะให้ผลจางๆ นอกจากนี้เมื่อใช้ DiagXotics probe ที่ใช้ตรวจเชื้อ HPV_{chin} มาทำ Southern blot กับผลผลิต PCR ที่ได้จาก HPV_{chin} และ HPV_{mon} จะให้ผล hybridization กับ HPV_{mon} อย่างอ่อนเมื่อเทียบกับ HPV_{chin} ผู้วิจัยจึงนำผลผลิต PCR ขนาด 732 คู่เบส ที่ได้จาก HPV_{mon} มาติดฉลากด้วย digoxigenin และนำไปทำ *in situ* hybridization พบว่า DNA probe ที่ออกแบบนี้

สามารถจับกับเนื้อเยื่อตับกึ่งกลูตาที่ติดเชื้อ HPV แต่ไม่จับกับเนื้อเยื่อตับกึ่งปกติและกึ่งที่ติดไวรัสชนิดอื่น ผลการทดลองนี้จึงเป็นการยืนยันว่าผลผลิต PCR ขนาด 732 คู่เบส ที่เกิดขึ้นได้มาจากเชื้อ HPVmon อย่างแท้จริง และเมื่อนำผลผลิต PCR จากเชื้อ HPVmon ไปหาลำดับดีเอ็นเอและเปรียบเทียบกับลำดับดีเอ็นเอของ HPVchin พบว่าผลผลิต PCR นี้มีความคล้ายคลึงกับลำดับดีเอ็นเอของ HPVchin ตำแหน่งที่ 1,272-1,972 ถึงร้อยละ 78 ขณะที่ผลผลิต PCR ของเชื้อ HPVchin ขนาด 350 คู่เบส จะได้จากตำแหน่งที่ 1,642-1,990 (Phromjai; et al. 2001: 153–158) จากข้อมูลที่ทราบก่อนหน้านี้เกี่ยวกับจีโนมทั้งหมดของ HPVchin (ความยาวประมาณ 4 กิโลเบส) และ HPVmon (ความยาวประมาณ 6 กิโลเบส) มีความยาวต่างกันประมาณ 2 กิโลเบส (Bonami; et al. 1995 : 813–817; Sukhumsirichart; et al. 1999 : 1–10) และการศึกษาลำดับดีเอ็นเอแสดงให้เห็นว่าเชื้อ HPV ที่พบในกึ่งต่างชนิดและต่างภูมิประเทศจะมีลักษณะแตกต่างกัน

ในปีต่อมามีการศึกษาลำดับดีเอ็นเอของ HPVmon ที่แยกจากกึ่งกลูตาในประเทศไทยพบว่ามีความแตกต่างจาก HPVchin ประมาณร้อยละ 30 และจากการทดสอบความไวในการตรวจ HPVmon ด้วย PCR primer และ hybridization probe ที่ออกแบบสำหรับ HPVchin พบว่า PCR primer และ hybridization probes สามารถตรวจหา HPVmon ได้แต่มีความไวต่ำเมื่อเทียบกับการตรวจ HPVchin จึงทำการปรับปรุงการตรวจหาเชื้อ HPVmon โดยนำผลผลิต PCR ขนาด 732 คู่เบส ที่ได้จาก HPVmon มาออกแบบ primer (H441F และ H441R) และ hybridization probe ซึ่ง primer ที่ออกแบบสามารถตรวจดีเอ็นเอของ HPVmon ได้ถึง 1 เฟมโตกรัม และให้ผลผลิต PCR ขนาด 441 คู่เบส นอกจากนี้เมื่อนำผลผลิต PCR มาติดฉลากด้วย digoxigenin ไปทำ *in situ* hybridization และ hybridization blot พบว่าให้ผลจำเพาะกับเนื้อเยื่อตับกึ่งกลูตาที่ติดเชื้อ HPVmon และ ให้ผลลบกับดีเอ็นเอของไวรัสชนิดอื่นรวมทั้งดีเอ็นเอของกึ่งกลูตา (Phromjai; et al. 2002: 227-232)

ได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อ HPV ในกึ่งกลูตาด้วยวิธี PCR-ELISA โดยใช้ primer 121F และ 276R (Sukhumsirichart; et al. 1999: 1-10) ที่จำเพาะต่อ HPV พบว่าสามารถตรวจเชื้อได้ถึงระดับ 0.01 เฟมโตกรัม ของดีเอ็นเอ จากเชื้อ HPV และไม่พบปฏิกิริยาข้ามเมื่อใช้ต้นแบบจาก WSSV, YHV, MBV และกึ่งปกติ เมื่อใช้เทคนิคนี้ตรวจกึ่งที่เป็นพาหะของ HPV 87 ตัว พบว่าเทคนิคนี้มีประสิทธิภาพในการตรวจและมีความไวสูงเมื่อเทียบกับการทดสอบทางพยาธิวิทยาและวิธี PCR โดยตัวอย่างกึ่งที่ทดสอบทางพยาธิวิทยาที่ให้ผลลบ เมื่อนำมาตรวจโดย PCR-ELISA พบว่าให้ผลบวกถึงร้อยละ 62 ดังนั้น PCR-ELISA จึงเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะ มีประโยชน์ในการตรวจการติดเชื้อในระยะแรกของผู้ป่วยรวมถึงตรวจหาพาหะของการติดเชื้อได้อีกด้วย (Sukhumsirichart; et al. 2002: 409-413)

ในช่วงเดือนมกราคม 2001 ถึง 2003 เกิดการระบาดของ HPV ในฟาร์มเลี้ยงกุ้งของประเทศอินเดีย จึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อ HPV ด้วยวิธี nested polymerase chain reaction (nested PCR) (Manjanaik; et al. 2005: 255-259) ในการตรวจเชื้อเริ่มจากนำ primer H441F และ H441R (Phromjai; et al. 2002 : 227-232) ซึ่งทำให้ได้ผลผลิต PCR ขนาด 441 คู่เบส

มาออกแบบ primer สำหรับ nested PCR ภายในผลผลิต PCR นั้น ซึ่ง primer ที่ออกแบบนี้จะให้ผลผลิตขนาด 256 คู่เบส จากการตรวจตัวอย่างกุ้งสายพันธุ์ต่างๆ 119 ตัวอย่าง พบว่า เมื่อทำ PCR โดยใช้ primer H441F และ H441R ให้ผลบวกเพียง 9 ตัวอย่าง แต่เมื่อตรวจโดยวิธี nested PCR ให้ผลบวก 69 จาก 119 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างกุ้งที่ให้ผลบวกกับ PCR ปกติ คือ *P. monodon*, *P. indicus* และ *P. semisulcatus* ส่วนตัวอย่างกุ้งที่ให้ผลบวกกับ nested PCR คือ *Parapenaeopsis stylifera*, *P. japonicus*, *Metapenaeus monoceros*, *M. affinis*, *M. elegans*, *M. dobsoni*, *M. ensis* และ *Solenocera choprai*

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและจีโนมของเชื้อ HPV

ในปี 2002 มีรายงานการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอและโปรตีนของไวรัสใน subfamily Densovirinae จากข้อมูลใน GenBank ซึ่งประกอบด้วยไวรัสในแมลง (insect parvovirus) และไวรัสกุ้ง (shrimp parvovirus) สำหรับไวรัสในแมลงที่นำมาวิเคราะห์ คือ *AaeDNV*, *Aa/DNV*, *Junonia coenia* densovirus (*JcDNV*), *Galleria mellonella* densovirus (*GmDNV*), *Bombyx mori* densovirus (*BmDNV*), *Diatraea saccharalis* densovirus (*DsDNV*) และ *Periplaneta fuliginosa* densovirus (*PfDNV*) ส่วนไวรัสกุ้ง คือ *HPVmon* จากกุ้งกุลาดำ, *HPVchin* จากกุ้ง *P. chinensis*, *spawn-isolated mortality virus* จากกุ้งกุลาดำ (*SMVmon*) และ *IHHNV* จากกุ้งขาว *P. vannamei* โดยขนาดของอนุภาคไวรัสทั้งหมดอยู่ในช่วง 18-30 นาโนเมตร และมีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ขนาด 4-6 กิโลเบส จากการใช้โปรแกรม Blast หรือ ClustalW พบว่า ไม่มีบริเวณใดของไวรัสที่คล้ายกันนอกจากดีเอ็นเอของ *HPVmon* และ *HPVchin* ที่มีความคล้ายกันถึงร้อยละ 77 เมื่อนำโปรตีนที่คาดว่าเป็นแคปซิดโปรตีน และ nonstructural protein มาสร้าง phylogenetic tree สามารถแบ่งไวรัสออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *SMVmon*, *PfDNV*, *DsDNV*, *GmDNV*, *JcDNV* และ *BmDNV* ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *HPVmon*, *HPVchin*, *IHHNV*, *AaeDNV* และ *Aa/DNV* แสดงให้เห็นว่าไวรัสทั้ง 4 ชนิด มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไวรัสแมลง 2 ชนิด อาจเป็นไปได้ว่าไวรัสอาจมีความสัมพันธ์ระหว่าง host ที่เป็น arthropod มาเป็นเวลายาวนาน (Roekring; et al. 2002: 79–87)

ในระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงเดือนธันวาคม 2002 มีการเก็บตัวอย่างกุ้งกุลาดำระยะ postlarvae ในประเทศอินเดีย จากโรงเพาะฟัก 10 และ 12 แห่งทางชายฝั่งทะเลตะวันตกและตะวันตกของประเทศตามลำดับ และตัวอย่างจากเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำจากชายฝั่งทะเลต่างๆ มาศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อ HPV ด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer H441F และ H441R ที่ออกแบบสำหรับตรวจเชื้อ HPV จากกุ้งกุลาดำในประเทศไทย (Phromjai; et al. 2002: 227-232) พบว่าตัวอย่างกุ้งจากโรงเพาะฟักและจากเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำจากชายฝั่งทะเลต่างๆ ติดเชื้อ HPV ถึงร้อยละ 34 และร้อยละ 31 ตามลำดับ แต่เมื่อใช้ primer 1120F และ 1120R ที่ออกแบบสำหรับตรวจเชื้อ HPV จากกุ้ง *P. chinensis* ในประเทศเกาหลี (Pantoja; & Lightner. 2000: 177–

182) มาตรฐานตัวอย่างเดียวกันกลับให้ผลลบ งานวิจัยนี้จึงเสนอว่า เชื้อ HPV ที่ติดในกึ่งกลาดำจากประเทศอินเดียมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อ HPV ที่ติดในกึ่งกลาดำจากประเทศไทยมากกว่าเชื้อ HPV จากกึ่ง *P. chinensis* ในประเทศเกาหลี (Rudrappa; et al. 2003: 141-146)

ในปี 2007 มีการศึกษาจีโนมของเชื้อ HPV ที่แยกจากกึ่งแชบ๊วย (*Penaeus merguensis*) ทางเหนือของรัฐควีนส์แลนด์ในประเทศออสเตรเลีย พบว่ามีความยาวประมาณ 5.9 กิโลเบส และมีความคล้ายคลึงกับลำดับดีเอ็นเอบางส่วน (ขนาด 3,350 คู่เบส) ของ HPV_{chin} จากกึ่ง *P. chinensis* ในประเทศเกาหลีและลำดับดีเอ็นเอทั้งหมด (ขนาด 6,321 คู่เบส) ของ HPV_{mon} จากกึ่งกลาดำในประเทศไทยถึงร้อยละ 87 และเมื่อเทียบกับลำดับดีเอ็นเอของ HPV (ขนาด 391 คู่เบส) จากกึ่ง *Penaeus semisulcatus* (HPV_{semi}) ในประเทศอินเดียมีความคล้ายคลึงเพียงร้อยละ 83 จากการศึกษาโครงสร้างและองค์ประกอบจีโนมของ HPV จากกึ่งแชบ๊วยนี้ (*PmergDNV*) พบว่ามี 3 ORFs ตั้งอยู่บนสาย complementary (plus) strand คือ ORF1 มีความคล้ายคลึงกับ nonstructural protein (NS2) ของ HPV_{mon} ถึงร้อยละ 86 ส่วน ORF2 มีความคล้ายคลึงกับ nonstructural protein (NS1) ของ HPV_{mon} ถึงร้อยละ 93 และ ORF3 เป็นรหัสในการสังเคราะห์แคปซิดโปรตีนของไวรัสโดยมีความคล้ายคลึงกับ แคปซิดโปรตีนของ HPV_{mon} และ HPV_{chin} ร้อยละ 73 (Fauce; Elliman; & Owens. 2007: 397-403)

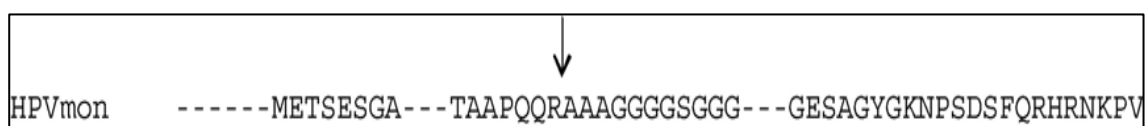
อย่างไรก็ตามจากที่กล่าวมาเบื้องต้นจะเห็นว่าเชื้อ HPV ในกึ่งแต่ละชนิดและแต่ละประเทศจะมีความแตกต่างกันจึงจำเป็นต้องศึกษาลักษณะของ HPV ในกึ่งแต่ละชนิดต่อไป

การตรวจเชื้อ HPV โดยเทคนิคทางวิทยาภูมิคุ้มกัน

ได้มีรายงานการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ HPV โดยแยกเชื้อ HPV จากกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อและยืนยันโดยทำ PCR และ SDS-PAGE จากนั้นนำ HPV ที่แยกได้ไปฉีดกระตุ้นหนูเพื่อผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี หลังจากหลอมรวมเซลล์ม้ามของหนูที่ถูกกระตุ้นกับ P3X myeloma cell และคัดเลือกแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HPV โดยวิธี dot blotting แล้วจึงเลือกครั้งที่สองโดยวิธี Western blotting ปรากฏว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี 4 โคลนสามารถจับกับเชื้อ HPV ได้ และเมื่อทดสอบโดยวิธี immunohistochemistry กับกึ่งที่ติดเชื้อ พบว่าสามารถจับกับ intranuclear inclusion bodies ใน tubule epithelial cells และไม่มีการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับกึ่งที่ไม่ติดเชื้อหรือกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสชนิดอื่น (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89)

แคปซิดโปรตีนของ HPV ขนาด 57 กิโลดาลตัน

การศึกษาโครงสร้างและองค์ประกอบจีโนมของ HPV พบว่ายีนที่เป็นรหัสสำหรับสร้างแคปซิดโปรตีนของ HPV อยู่ที่ยีนบริเวณ right open reading frames (ORF 3) ตำแหน่งที่ 3,642 ถึง 6,098 มีความยาว 2,546 นิวคลีโอไทด์ และมี start codon ตำแหน่งแรกตรงกับ Kozak consensus sequence (Kozak. 1986 : 283–292) อยู่ 3 ใน 7 นิวคลีโอไทด์ ถ้าการแปลรหัส (translation) เกิดที่ตำแหน่งนี้ จะได้โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 818 ตัว ขนาดของโปรตีนที่ได้จากการคำนวณ (deduced molecular weight) คือ 92 กิโลดาลตัน แต่ขนาดจริงที่ได้จากการแยกบน SDS-PAGE มีขนาดประมาณ 57 และ 54 กิโลดาลตัน ตามลำดับ เมื่อนำแคปซิดโปรตีนไปหาลำดับกรดอะมิโนพบว่าโปรตีนทางปลาย N มีลำดับเริ่มต้นที่ alanine ดังนี้ AAAGGGGSGGGGESA แสดงว่าเกิด proteolytic cleavage หลังกรดอะมิโน arginine ที่ตำแหน่ง 271 และ 298 ทำให้ได้โปรตีนขนาด 57 และ 54 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (Sukhumsirichart; et al. 2006 : 266-277) (ภาพประกอบ 5)



ภาพประกอบ 5 ลำดับกรดอะมิโนของแคปซิดโปรตีนบางส่วนของ HPV ที่ได้จากการวิเคราะห์ โดยเทียบกับ SWISSPROT database ลูกศรแสดงตำแหน่งที่เกิด proteolytic cleavage ระหว่าง arginine กับ alanine เมื่อนำแคปซิดโปรตีนไปหาลำดับกรดอะมิโนจึงพบว่าโปรตีนทางปลาย N มีลำดับเริ่มต้นที่ AAAGGGGSGGGGESA และมีขนาด 57 กิโลดาลตัน

ที่มา : ดัดแปลงจาก Wasana Sukhumsirichart; et al. (2006). *Complete nucleotide sequence and genomic organization of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of Penaeus monodon*. *Virology*. (346): p. 270.

จากความรู้เกี่ยวกับจีโนมของ HPV นี้เป็นประโยชน์ในการนำลำดับดีเอ็นเอของยีนแคปซิดโปรตีนมาโคลนและแสดงออกเพื่อใช้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของไวรัส HPV เป็นแอนติเจนในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีและพัฒนาเป็นโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อไป เนื่องจากแคปซิดโปรตีนเป็นโปรตีนโครงสร้างส่วนนอกสุดของไวรัสเพียงชนิดเดียว (Sukhumsirichart; et al. 2006: 266–277) จึงเป็นแอนติเจนที่เหมาะสมแก่การตรวจวินิจฉัยกึ่งที่ติดเชื้อ HPV โดยใช้แอนติบอดี นอกจากนี้การใช้รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนสามารถผลิตโปรตีนได้ตามต้องการโดยไม่จำเป็นต้องแยกเชื้อไวรัสจากกึ่งที่ติดเชื้อ งานวิจัยนี้จึงออกแบบ primer เพื่อเพิ่มจำนวนยีนที่เป็นรหัสสำหรับ

สร้างแคปซิดโปรตีนของ HPV ที่เบสตำแหน่ง 4,455 ถึง 6,098 ซึ่งเป็นบริเวณที่ถูกนำมาสร้าง แคปซิดโปรตีนอย่างแท้จริง โดยออกแบบ primer เพื่อเพิ่มจำนวนส่วนที่เป็นรหัสทางด้านปลาย N (HPVN) ตรงกับเบสตำแหน่งที่ 4,455 ถึง 5,309 และส่วนที่เป็นรหัสทางด้านปลาย C (HPVC) ตรงกับเบสตำแหน่งที่ 5,310 ถึง 6,098 ของแคปซิดโปรตีน โดย primer ที่ใช้เพิ่มจำนวน HPVN จะให้ ได้ผลผลิต PCR ขนาด 873 คู่เบส แปลรหัสให้โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 285 ตัว และ primer ที่ใช้เพิ่มจำนวน HPVC จะให้ได้ผลผลิต PCR ขนาด 806 คู่เบส แปลรหัสให้โปรตีนที่ ประกอบด้วยกรดอะมิโน 262 ตัว (ภาพประกอบ 6 และ 7 ตามลำดับ)

HPVF70N3

4452 **cgagctgctgcgggcggcggcggtag**cgggaggcggaggagaatct
 R A A A G G G G S G G G E S
 4497 gcaggggtacggaaaaaccccagcgattcattccagcgccaccgc
 A G Y G K N P S D S F Q R H R
 4542 aataaaccggttgatctcaaacacatcggagacaacgtatatgtg
 N K P V D L K H I G D N V Y V
 4587 gctcagagagttttataaggtagaagctgagtgtaaactggtaggg
 A Q R V Y K V E A E C K L V G
 4632 gacaagttatcgtggtcaaacacgacaaacagtaaatatctcagg
 D K L S W S N T T N S K Y L R
 4677 agactgtttgggaataaacggcaacagtaactctggagatattaag
 R L L G I N G N S N S G D I K
 4722 cacagtttctacacacagctatctggaagtattggtttgggaat
 H S F Y T Q L S G S I G L G N
 4767 cttgctctgggtaactacataaactcgtggggtatggacaacata
 L A L G N Y I N S W G M D N I
 4812 tccaagagcggagacagttgggctatcatagccaccaggggcaag
 S K S E D S W A I I A T R G K
 4857 atgaaccatctacaggcatttgagatggttcacaataccaagga
 M N H L Q A F E M V P Q Y Q G
 4902 gaaactgtagtgggatatacaagtgcaccgctacagtttggtaaa
 E T V V G Y T S A P L Q F G K
 4947 cttttgggacatgtatactatccagatcccaaagggtgaagaaagg
 L L G H V Y Y P D P K G E E R
 4992 ataaagatagcaagtaaagctgatgccaaagaatctaagatgttt
 I K I A S K A D A K E S K M F
 5037 aaggatgcaatggcagggttatctattagatgacgacatgaaccag
 K D A M A G Y L L D D D M N Q
 5082 acaaaagtcacatcagaacacaaccacgtatttgattcacagac
 T K V T S E H N H V F A F T D
 5127 ttgagagattcgccagtaataagcgaagtagcagcataccagacc
 L R D S P V I S E V A A Y Q T
 5172 aacgatgaaccacaaaaataaatggcattggaatagaataccag
 N D E P P K I N G I G I E Y Q
 5217 ggattcaacttaacatcagacacaaatgcagctctcattggtctc
 G F N L T S D T N A A L I G L

HPVR924

5262 atgccaaagtaactgtataaagagaagg**gaaggagatcacagtcagg**t
 M P S N C I K R R K E I Q S G

5307 **atg**
 M

ภาพประกอบ 6 ลำดับเบสและกรดอะมิโนของโปรตีน HPV N โดยเครื่องหมายลูกศรแสดงตำแหน่ง
 และทิศทางของลำดับเบสที่นำไปใช้ออกแบบสำหรับสร้าง primer ที่ใช้ในการทดลอง โดยชื่อ
 ของ primer กำกับอยู่บนลูกศร ซึ่ง primer HPVF70N3 มีการเติม *Sa*I restriction site
 (ขีดเส้นใต้) (**GCGT**CG**AC**) ส่วน primer HPVR924 ได้ทำการเติม *Not*I restriction site
 (ขีดเส้นใต้) (**TTGCGG**CC**GC**) ที่ปลาย 5' (Genbank accession no: DQ002873)

HPVF925

5307 at**ggacaacgtagtactatgg**tccatgaagagtaacagactcata
 M D N V V L W S M K S N R L I
 5352 gacaaaagatttttgaagccagaaggatggaccaaaaagagcatg
 D K R F W K P E G W T K K S M
 5397 aacggtatggctaaagacaaagtgaacattacaccaacaacctat
 N G M A K D K V N I T P T T Y
 5442 gatatatatgaagaagctcacgtaaccaggacaacagattatgca
 D I Y E E A H V T R T T D Y A
 5487 gaatgggctaggaatgaaatatttctatgatgcaaacacttcatac
 E W A R N E I F Y D A N T S Y
 5532 ggaagtgttggaaccaagtgcacataggaaattttgtacagaaatac
 G S V G P S D I G N F V Q K Y
 5577 aacttatcagaccaatatgctacagacatatattctttatgccatat
 N L S D Q Y A T D I F F M P Y
 5622 gttcacacacagagaggcataattcaagacatagtcataaatttt
 V H T Q R G I I Q D I V I N F
 5667 gacttaacaatgcaaattatggtcaagagaattccacgtcaagta
 D L T M Q I M V K R I P R Q V
 5712 tataatgatttctaccacatcaacactagagccatgaaccagtt
 Y N D F Y H I N T R A M N P V
 5757 aaatatgacagtgcggtagaaagatcattcggatacgacgaaata
 K Y D S A V E R S F G Y D E I
 5802 tatgcaagatccataaaaatacatgaaaacataagtggaactcat
 Y A R S I K I H E N I S G T H
 5847 ggaagtaagtatgcagatagaggaccaataagtcatatggaagca
 G S K Y A D R G P I S H M E A
 5892 acaaagaggaactcttaccagagagcatatgcacagagaagaata
 T K R N S Y Q R A Y A Q R R I
 5937 atactagatcaggggtgtatcaaaaatgaagacaagaagtagtgcg
 I L D Q G V S K M K T R S S A
 5982 gcggcggaagatgacattccagaagattgtgacgacttcctagaa
 A A E D D I P E D C D D F L E
 6027 acttctgaaatggatccaccgccgcagccgcagttgccgaagaag
 T S E M D P P P Q P Q L P K K

HPVR

6072 aagaag**aaatatagagttaatgtataa** 6098
 K K K Y R V N V *

ภาพประกอบ 7 ลำดับเบสและกรดอะมิโนของโปรตีน HPVC โดยเครื่องหมายลูกศรแสดงตำแหน่ง
 และทิศทางของลำดับเบสที่นำไปใช้ออกแบบสำหรับสร้าง primer ที่ใช้ในการทดลอง โดยชื่อ
 ของ primer กำกับอยู่บนลูกศร ซึ่ง primer HPVF925 มีการเติม *SalI* restriction site
 (ขีดเส้นใต้) (GCGTCGAC) ส่วน primer HPVR ได้ทำการเติม *NotI* restriction site
 (ขีดเส้นใต้) (TTGCGGCCGC) ที่ปลาย 5' (Genbank accession no: DQ002873)

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี

เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย ลิมโฟไซต์ชนิด B (B cell) จำนวนมากจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และมีการพัฒนาต่อไปจนกระทั่งทำหน้าที่ได้อย่างสมบูรณ์ ลิมโฟไซต์ชนิด B แต่ละเซลล์จะผลิตแอนติบอดีที่แตกต่างกันไป แอนติบอดีผสมเหล่านี้เรียกว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) เพราะว่าแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นมามีความจำเพาะต่ออีพิโทปต่างๆ ที่อยู่บนผิวของแอนติเจนได้ในเวลาเดียวกัน ในทางตรงกันข้ามโมโนโคลนของเซลล์เพาะเลี้ยง (cultured cell) โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ทั้งหมดนี้ จะมีความจำเพาะต่ออีพิโทปของแอนติเจนเพียงอีพิโทปเดียวเหมือนกัน (สุทธิพันธ์; และคนอื่นๆ. 2537)

การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี คิดค้นในช่วงกลางปี 1970 (Köhler; & Milstein. 1976: 511-519) สำหรับวิธีการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีนั้นทำได้โดยฉีดแอนติเจนที่สนใจเข้าไปในหนู จากนั้นหนูก็จะมี การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน โดยการที่ม้ามของหนูจะกระตุ้นลิมโฟไซต์ชนิด B ให้จดจำแอนติเจน จากนั้นนำลิมโฟไซต์ชนิด B จากม้ามของหนูมาผสมกับ myeloma cell หรือ malignant B cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวได้ไม่จำกัด เมื่อเซลล์ 2 ชนิดเกิดการหลอมรวมกัน จะได้เซลล์ใหม่เรียกว่า ไฮบริโดมา

ไฮบริโดมามีส่วนหนึ่งของเซลล์มีคุณสมบัติของ myeloma cell ขณะเดียวกันอีกส่วนหนึ่งมีคุณสมบัติของเซลล์ม้าม ทำให้ไฮบริโดมาสามารถหลั่งแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเพียงชนิดเดียวได้ ซึ่งเรียกว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี การหลอมรวม myeloma cell กับ B cell จากสัตว์ที่ปลูกภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนที่ต้องการให้สร้างแอนติบอดีสามารถทำได้โดยใช้พอลิเอทิลีนไกลคอลในทางปฏิบัตินี้ไม่สามารถหลอมรวมเซลล์เพื่อผลิตไฮบริโดมาได้ทั้งหมด จึงมีทั้งเซลล์ที่หลอมรวมกันเองและไม่หลอมรวมกัน และมีไฮบริโดมาที่ไม่ต้องการปะปนอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงต้องหาภาวะที่เลือกให้เฉพาะไฮบริโดมาเท่านั้นสามารถมีชีวิตรอดและเจริญเติบโตได้ วิธีที่ใช้ทั่วไปได้แก่การใช้ myeloma cell ที่มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ในวิถี salvage ซึ่งทำให้ไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย hypoxanthine, aminopterin และ thymidine (HAT medium) เมื่อนำเซลล์ผสมที่ได้มาเลี้ยงใน HAT medium นี้ myeloma cell ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ แต่ไฮบริโดมาที่หลอมรวมระหว่าง myeloma cell กับ B cell เท่านั้นที่สามารถมีชีวิตรอด เพราะได้เอนไซม์ในวิถี salvage จาก B cell ส่วน B cell ที่ไม่หลอมรวมกันหรือหลอมรวมกันเองจะมีชีวิตรอดเพียงระยะเวลาสั้น ๆ และตายไปเองในที่สุด (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)

การผลิตไฮบริโดมานั้นมักจะใช้ myeloma cell ที่มีความบกพร่อง 2 ประการด้วยกันคือ มีความบกพร่องในการสังเคราะห์เอนไซม์ HGPRT (HGPRT⁻) และไม่สามารถสร้างอิมมูโนโกลบูลินได้ (Ig⁻) เพื่อให้แน่ใจว่าการสร้างแอนติบอดีจากไฮบริโดมานั้นเป็นการถอดรหัสการสร้างมาจากยีนของเซลล์ม้ามและ myeloma cell เพียงแต่ทำให้เซลล์สามารถเจริญได้ไม่มีที่สิ้นสุดเท่านั้น เมื่อได้ไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีแล้ว ต้องมีการคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ

แอนติเจนที่ต้องการเนื่องจากมีไฮบริโดมาบางเซลล์เท่านั้นที่ผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ให้แก่สัตว์ทดลอง วิธีที่ใช้คัดเลือกโดยทั่วไปได้แก่ ELISA และการทดสอบทางวิทยามุมคุ้มกันรูปแบบต่าง ๆ เช่น dot blotting, Western blotting, immunohistochemistry และอื่น ๆ ตามความเหมาะสม เมื่อคัดเลือกไฮบริโดมาที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่ต้องการได้แล้วต้องทำการโคลนซ้ำ (reclone) เพื่อให้แน่ใจว่าไฮบริโดมานั้นมีต้นกำเนิดมาจากไฮบริโดมาเซลล์เดียวจริง ๆ และขยายเพิ่มจำนวนเพื่อ ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีให้ได้ปริมาณตามที่ต้องการต่อไป (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)

ถึงแม้ว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีจะผลิตขึ้นเป็นครั้งแรกในปี 1975 และใช้เป็นเครื่องมือในการวิจัย นักวิทยาศาสตร์ได้นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีมาใช้ในหลายๆ ด้านโดยเฉพาะในการตรวจวินิจฉัยโรคและการบำบัดโรค การตรวจวินิจฉัยโรคในหลายๆ กรณีได้ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีมาเป็นเครื่องมือในการตรวจวินิจฉัยโรคอย่างได้ผล โดยทั่วไปวิธีการเหล่านี้มีความไวและความแม่นยำมากกว่าวิธีการที่เคยใช้กันมาก่อนหน้านี้ ซึ่งในปัจจุบันจะพบการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในการวินิจฉัยการตั้งครรภ์ โรคจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ วัดปริมาณยาในเลือด ตรวจความเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อ และตรวจแอนติเจนของเซลล์มะเร็งบางชนิด (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. ดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อ HPV

แยกดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อ HPV โดยใช้ชุด High pure viral nucleic acid kit จาก Roche Molecular Biochemical (เนื้อเยื่อกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อ HPV ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.วาสนา สุขุมศิริชาติ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ)

2. สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

- 2.1 หนูขาว จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา
- 2.2 กึ่งกลาดำที่ติดเชื้อ HPV

3. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ตาราง 1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
1.1 เครื่อง thermal cycler	Eppendorf
1.2 เครื่อง electrophoresis apparatus และ อุปกรณ์	Bio-Rad
1.3 ชุด Mini-protein III electrophoresis	Bio-Rad
1.4 ชุด transblot apparatus	Bio-Rad

4. เคมีภัณฑ์

ตาราง 2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท
2.1 ชุด Platinum [®] Pfx DNA Polymerase	Invitrogen
2.2 primer HPV70N3, HPV925 , HPV924 และ HPV8	Bioservice Unit (BSU)
2.3 เอนไซม์ตัดจำเพาะ	New England Biolab, Promega
2.4 T4 DNA ligase	Vivantis
2.5 ชุด PCR Blunt Cloning kit	Invitrogen
2.6 pGEX-6-P-1 expression vector	Amersham
2.7 ชุด MinElute gel extraction kit	Qiagen
2.8 ชุด QIAprep [®] Spin Miniprep kit	Qiagen
2.9 ยาปฏิชีวนะ (Ampicillin และ Kanamycin)	Sigma
2.10 Fetal bovine serum	Starrate
2.11 polyethylene glycol (PEG)	Sigma
2.12 DMSO	Sigma
2.13 hypoxanthine	Gibco
2.14 aminopterin	Sigma
2.15 nitrocellulose membrane	
2.16 ชุด Zymed's Mouse MonoAb kit (HRP)	Zymed
2.17 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)	Sigma
2.18 Goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugate (GAM-HRP)	Bio-Rad

5. สายพันธุ์แบคทีเรียและชนิดของพลาสมิด

ตาราง 3 สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

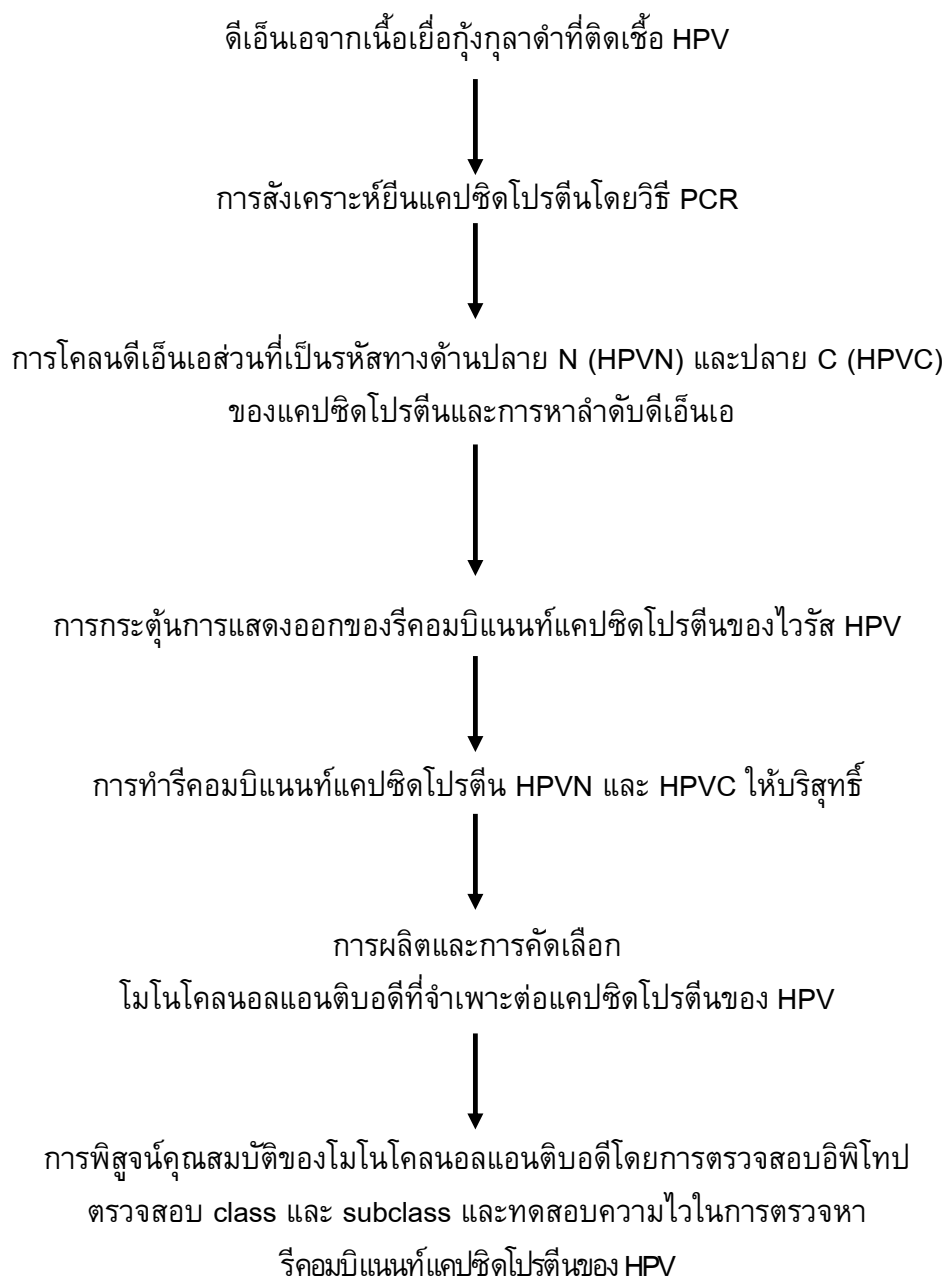
สายพันธุ์ของ <i>E. coli</i>	คุณสมบัติ
3.1 <i>E. coli</i> Top10	$F^- mcrA \Delta (mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi 80 lacZ \Delta M15 \Delta lacX74$ $recA1 araD139 \Delta (ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG$
3.2 <i>E. coli</i> XL1 blue	$recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB$ $lacI^q ZM15 Tn10 (Tet^r)]$
3.3 <i>E. coli</i> BL 21	$non-T7^3, dcm^{-18}, lon^{-10}$ and $ompT^{-9}$

ตาราง 4 ชนิดของพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

ชนิดของพลาสมิด	คุณสมบัติ
4.1 pCR [®] Blunt (Invitrogen)	P_{lac} , $lacZ\alpha$ - $ccdB$ fusion gene, Multiple cloning site, T7 promoter, M13 Forward (-20), M13 Reverse priming sites, Kan^r , $Sh ble$ (Zeocin [™] resistance factor) และ pUC origin
4.2 pGEX-6P-1 (Amersham)	Amp^r , tac promoter, $lacI^q$, glutathione S-transferase tag coding sequence, pBR322 ori และ multiple cloning site downstream of tac promoter

วิธีดำเนินการทดลอง

ดำเนินการโดยภาพรวม



1. การสังเคราะห์ยีนแคปซิดโปรตีนและการโคลนส่วนที่เป็นรหัสทางด้านปลาย N (HPVN) และปลาย C (HPVC) ของแคปซิดโปรตีนของเชื้อ HPV

จากการทดลองเบื้องต้นได้ออกแบบ primer สำหรับเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีนทั้งยีน พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีนและนำเข้าสู่ pGEX-6P-1 expression vector ได้ แต่ไม่พบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนเมื่อกระตุ้นด้วย IPTG ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงออกแบบ primer สำหรับเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีนออกเป็นสองส่วนคือ HPVN และ HPVC

1.1 การสังเคราะห์ยีนแคปซิดโปรตีนด้วยวิธี PCR

ออกแบบ primer สำหรับเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีนส่วน HPVN และ HPVC ด้วยวิธี PCR จากบริเวณควบคุมการสังเคราะห์แคปซิดโปรตีนของ HPV (Genbank accession no: DQ002873) ซึ่งแต่ละ primer มีการเติมบริเวณที่ใช้ในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่ปลาย 5' เพื่อใช้สำหรับนำ HPVN และ HPVC เข้าสู่พลาสมิดที่เป็น expression vector โดย primer HPVF70N3 และ HPVF925 จะเติม *SaI* restriction site ส่วน primer HPVR924 และ HPVR ได้เติม *NotI* restriction site ที่ปลาย 5' ของ primer เหล่านั้น

Primer สำหรับเพิ่มจำนวน HPVN มีลำดับเบสดังนี้

Forward primer : HPVF70N3 5'-GCGTCGACGCTGCTGCGGGCGGCGGCGGTAG-3'

Reverse primer : HPVR924 5'-TTGCGGCCGCGCCATACCTGACTGTATCTCCTTC-3'

Primer สำหรับเพิ่มจำนวน HPVC มีลำดับเบสดังนี้

Forward primer : HPVF925 5'-GCGTCGACGACAACGTAGTACTATGGTC-3'

Reverse primer : HPVR 5'-TTGCGGCCGCGCTTATACATTAACCTCTATATTTTC-3'

(บริเวณที่ขีดเส้นใต้คือบริเวณที่ใช้ในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SaI* และ *NotI*)

ทำการสังเคราะห์ส่วน HPVN ด้วยวิธี PCR โดยใช้เอนไซม์ Platinum[®] Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) และผสมสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำ PCR ดังตาราง 5

ตาราง 5 ส่วนผสมของการทำ PCR เพื่อสังเคราะห์ส่วน HPV N

ส่วนผสมของ PCR reaction	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
DNA ของ HPV	5
10X <i>Pfx</i> buffer	5
10X Enhancer	5
2.5 mM dNTP	6
50 mM MgSO ₄	1
<i>Pfx</i> DNA Polymerase (25 unit/ไมโครลิตร)	0.4
HPVF70N3 primer (50 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
HPVR924 primer (50 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1
Deionized Water	25.6
ปริมาตรสุทธิ	50.0

นำหลอด thin wall ที่ผสมสารต่างๆเรียบร้อยแล้ว ใส่ในเครื่อง thermal cycle กำหนดอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มจำนวน HPV N โดยใช้อุณหภูมิในขั้นตอน denaturation และ extension ตามคู่มือของ Invitrogen สำหรับเอนไซม์ *Pfx* DNA Polymerase ดังนี้

- ขั้นตอนที่ 1 initial denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
- ขั้นตอนที่ 2 denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที
- ขั้นตอนที่ 3 annealing อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
- ขั้นตอนที่ 4 extension อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
- ขั้นตอนที่ 5 ทำซ้ำขั้นตอนที่ (2)-(4) เป็นจำนวน 35 รอบ
- ขั้นตอนที่ 6 final extension อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- ขั้นตอนที่ 7 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คงที่ตลอด

สำหรับการสังเคราะห์ HPVC ทำเช่นเดียวกับการทำ PCR ของ HPV N แต่เปลี่ยน primer เป็น HPVF925 และ HPVR แล้วนำผลผลิต PCR ที่ได้จากการทำ PCR มาวิเคราะห์ขนาดโดยใช้ 1% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วส่องดูผลภายใต้แสง UV สำหรับผลผลิต PCR ของ HPV N มีขนาด 873 คู่เบส และผลผลิต PCR ของ HPVC มีขนาด 806 คู่เบส จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการและสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุด MinElute gel extraction kit (QIAGEN) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ตัดเจลรอบๆ แถบที่ต้องการภายใต้แสง UV ซึ่งน้ำหนักเจลที่ได้ เติมน้ำบัฟเฟอร์ QG 300 ไมโครลิตร ต่อ 100 มิลลิกรัม ของน้ำหนักเจล (3 เท่าของน้ำหนักเจล) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที สีของสารละลายจะเหมือนกับสีของบัฟเฟอร์ QG (หากเปลี่ยนสีเติม 3M sodium acetate 10 ไมโครลิตร) จากนั้นเติม isopropanol 500 ไมโครลิตร แล้วดูดสารละลายใส่ใน MinElute™ Spin column นำไปปั่นที่ 16,000 x g นาน 1 นาที ที่ซึ่งสารละลายที่ผ่านออกมา และเติมน้ำบัฟเฟอร์ QG 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นที่ 16,000 x g นาน 1 นาทีที่ซึ่งสารละลาย ล้างสารที่ปนเปื้อนทิ้งโดยเติมน้ำบัฟเฟอร์ PE 750 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นแยกสารละลายทิ้งที่ 16,000 x g นาน 1 นาที ปั่นแยกบัฟเฟอร์ PE ที่ตกค้างอยู่ทิ้งที่ 16,000 x g นาน 1 นาที แล้วเติมน้ำบัฟเฟอร์ EB 12 ไมโครลิตร เพื่อชะเอาดีเอ็นเอที่ต้องการออกจาก column โดยนำไปปั่นอีกครั้งที่ 16,000 x g นาน 1 นาที แล้วเก็บสารละลายใสที่ได้ที่ -20 องศาเซลเซียส

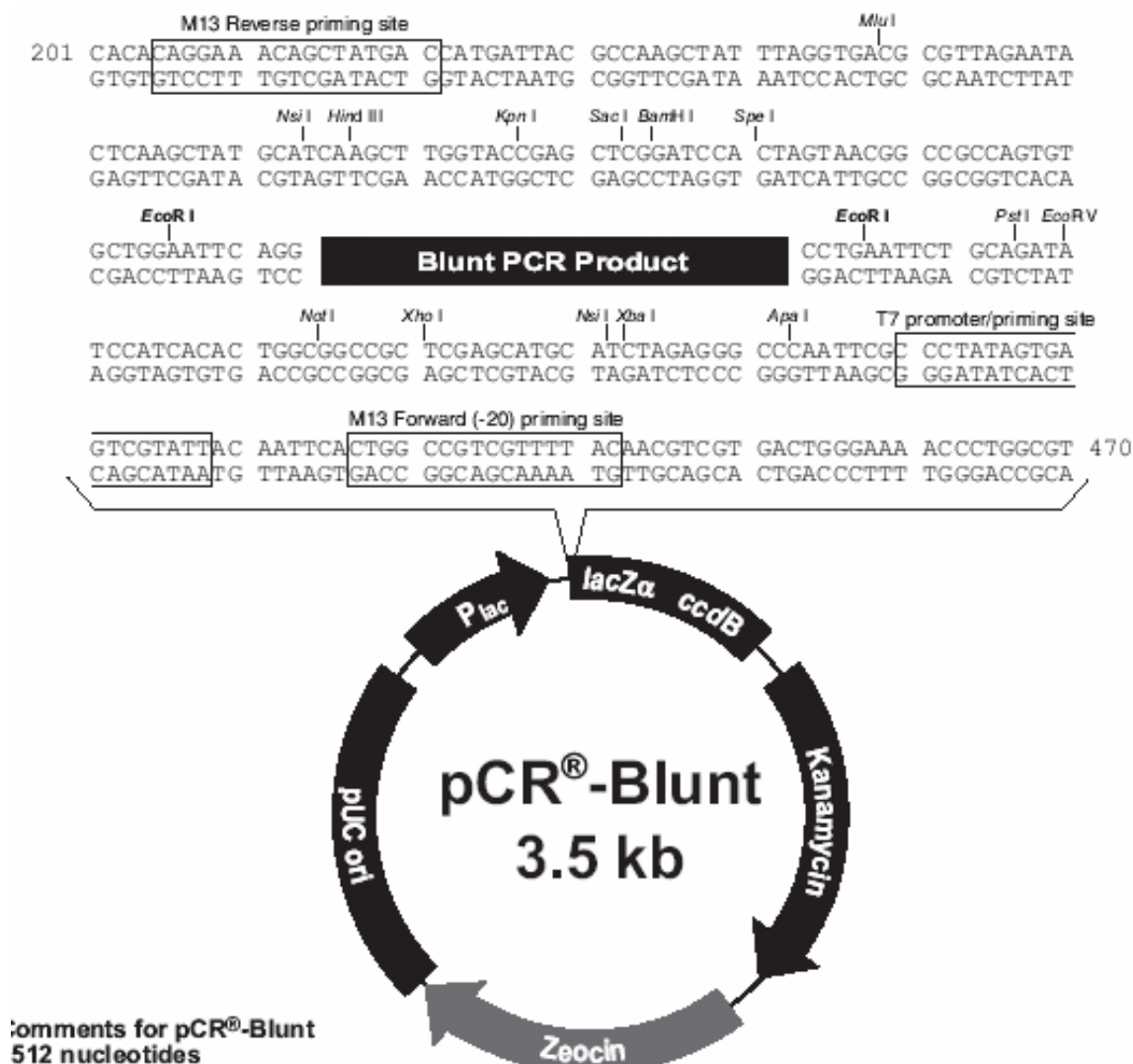
1.2 การโคลน HPVn และ HPVc เข้าสู่ pCR® Blunt vector และการนำพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* (transformation)

ทำการโคลนชิ้นส่วนของ HPVn และ HPVc เข้าสู่ pCR® Blunt vector (ภาพประกอบ 8) เนื่องจากผลผลิต PCR ของ HPVn และ HPVc ที่สังเคราะห์โดยใช้ Pfx® Polymerase (เอนไซม์ที่มี proofreading activity) จะให้ผลผลิตที่มีปลายทุ้ทั้ง 2 ด้านจึงต้องโคลนผลผลิต PCR นี้ เข้าสู่พลาสมิดที่มีปลายทุ้เช่นกัน โดยทำการโคลนเข้าสู่พลาสมิด pCR® Blunt vector จาก ZeroBlunt® PCR Blunt Cloning kit ตามคู่มือของ Invitrogen โดยผสมสารต่างๆ ดังตาราง 6

ตาราง 6 ส่วนผสมของการทำ ligation ของผลผลิต PCR กับ pCR® Blunt vector

ส่วนผสมของการ ligation	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
pCR-Blunt Vector (10 เฟมโตโมล/ไมโครลิตร)	1
ผลผลิตของ HPVn หรือ HPVc (25 เฟมโตโมล/ไมโครลิตร)	4
10X Ligation buffer	1
T4 DNA Ligase (200 unit/ไมโครลิตร)	0.5
Deionized Water	3.5
ปริมาตรสุทธิ	10.0

เมื่อผสมแล้วนำไปปั่นที่ 16 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อให้ดีเอ็นเอเชื่อมต่อกัน หลังจากนั้นจึงนำมา transform เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ TOP 10 ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ ปิเปตส่วนผสมของการทำ ligation จากตาราง 6 ใส่ในหลอดที่มี *E. coli* (200 ไมโครลิตร/หลอด) ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้ววางไว้บนน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นแช่ใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที (heat-shock) และแช่ในน้ำแข็งอีก 2 นาที จึงเติม SOC medium ซึ่งอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส จำนวน 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นใน incubator shaker ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 225 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นแบ่ง TOP 10 มา spread บน LB agar ที่มี kanamycin 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยปริมาตรเพลตละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 2 เพลต แล้วนำไปปั่นข้ามคืนที่ 37 องศาเซลเซียส คัดเลือกโคโลนีมาตรวจสอบต่อไป (Sambrook; Fritsch; & Maniatis. 2000)



ภาพประกอบ 8 โครงสร้างของ pCR[®]Blunt plasmid และตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ต่างๆ (restriction sites) (Invitrogen)

1.3 การคัดเลือกโคลนของ *E. coli* ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCR-Blunt-HPVN และ pCR-Blunt-HPVC

การคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอทำโดยนำโคลนที่คัดเลือกจากขั้นตอนที่ 1.2 มาเลี้ยงใน LB broth ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ที่เติม kanamycin (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) โดยเลี้ยงไว้ข้ามคืนใน incubator shaker ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 225 รอบต่อนาที จากนั้นนำ culture ที่เลี้ยงไว้มาทำการสกัดพลาสมิดแล้วตัดด้วย *Sall* และ *NotI* restriction enzyme ซึ่งควรจะได้ดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ที่มีขนาดประมาณ 3.5 กิโลเบส ของพลาสมิด (pCR[®] Blunt) และขนาดเท่ากับผลผลิต PCR ของ HPVn และ HPVc โดยสามารถสังเกตได้เมื่อทำการแยกโดยใช้ 1% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง แล้วส่องดูผลภายใต้แสง UV

การสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุด QIAprep[®] Spin Miniprep kit ตามคู่มือของ QIAprep Miniprep Handbook มีขั้นตอนดังนี้ นำเชื้อที่เตรียมไว้มาปั่นใน microcentrifuge tube ที่ 16,000 x g นาน 2 นาที เก็บตะกอนเชื้อมา resuspend ในบัฟเฟอร์ P1 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ P2 250 ไมโครลิตร และบัฟเฟอร์ N3 350 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ นำไปปั่นที่ 16,000 x g นาน 10 นาที ดูด supernatant ใส่ใน QIAprep[®] Spin column นำไปปั่นที่ 16,000 x g นาน 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ผ่านออกมาและเติมบัฟเฟอร์ PB 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นที่ 16,000 x g นาน 1 นาที ทิ้งสารละลาย ล้างสารที่ปนเปื้อนทิ้งโดยเติมบัฟเฟอร์ PE 750 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นแยกสารละลายทิ้งที่ 16,000 x g นาน 1 นาที ปั่นแยกบัฟเฟอร์ PE ที่ตกค้างอยู่ทิ้งที่ 16,000 x g นาน 1 นาที แล้วเติมบัฟเฟอร์ EB 50 ไมโครลิตร เพื่อชะเอาพลาสมิดที่ต้องการออกจาก column โดยนำไปปั่นอีกครั้งที่ 16,000 x g นาน 1 นาที เก็บสารละลายที่ได้ที่ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง โดยทำการผสมสารต่างๆ ดังตาราง 7

ทำการวิเคราะห์ผลการตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยแยกใน 1% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง ตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (Sambrook; Fritsch; & Maniatis. 2000)

ตาราง 7 ส่วนผสมของการตัดผลผลิต PCR ที่โคลนอยู่ใน pCR® Blunt vector ด้วย *Sall* และ *NotI*

ส่วนผสมของการตัดผลผลิต PCR	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
พลาสมิด (pCR-Blunt-HPVN หรือ pCR-Blunt-HPVC)	10
<i>Sall</i> restriction enzyme (20 unit/ไมโครลิตร)	0.5
<i>NotI</i> restriction enzyme (10 unit/ไมโครลิตร)	0.5
10X buffer 3	2
10X BSA	2
Deionized Water	5
ปริมาตรสุทธิ	20

1.4 การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ HPVN และ HPVC เข้าสู่ pGEX-6P-1 expression vector

เลือกรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของ HPVN และ HPVC ใน pCR-Blunt vector จากข้อ 1.3 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sall* และ *NotI* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำส่วนของ HPVN และ HPVC ที่ตัดได้โคลนเข้าสู่ pGEX-6P-1 ซึ่งเป็น expression vector (ภาพประกอบ 9)

การตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของ HPVN หรือ HPVC ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจะผสมส่วนต่างๆ ดังตาราง 8

ตาราง 8 ส่วนผสมของการตัดชิ้นส่วน HPVn หรือ HPVc ที่โคลนอยู่ใน pCR[®] Blunt vector ด้วย *Sall* และ *NotI*

ส่วนผสมของการตัดชิ้นส่วน HPVn หรือ HPVc	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
พลาสมิด (pCR-Blunt-HPVn หรือ pCR-Blunt-HPVc)	20
<i>Sall</i> restriction enzyme (20 unit/ไมโครลิตร)	1
<i>NotI</i> restriction enzyme (10 unit/ไมโครลิตร)	1
10X buffer 3	3
10X BSA	3
Deionized Water	2
ปริมาตรสุทธิ	30

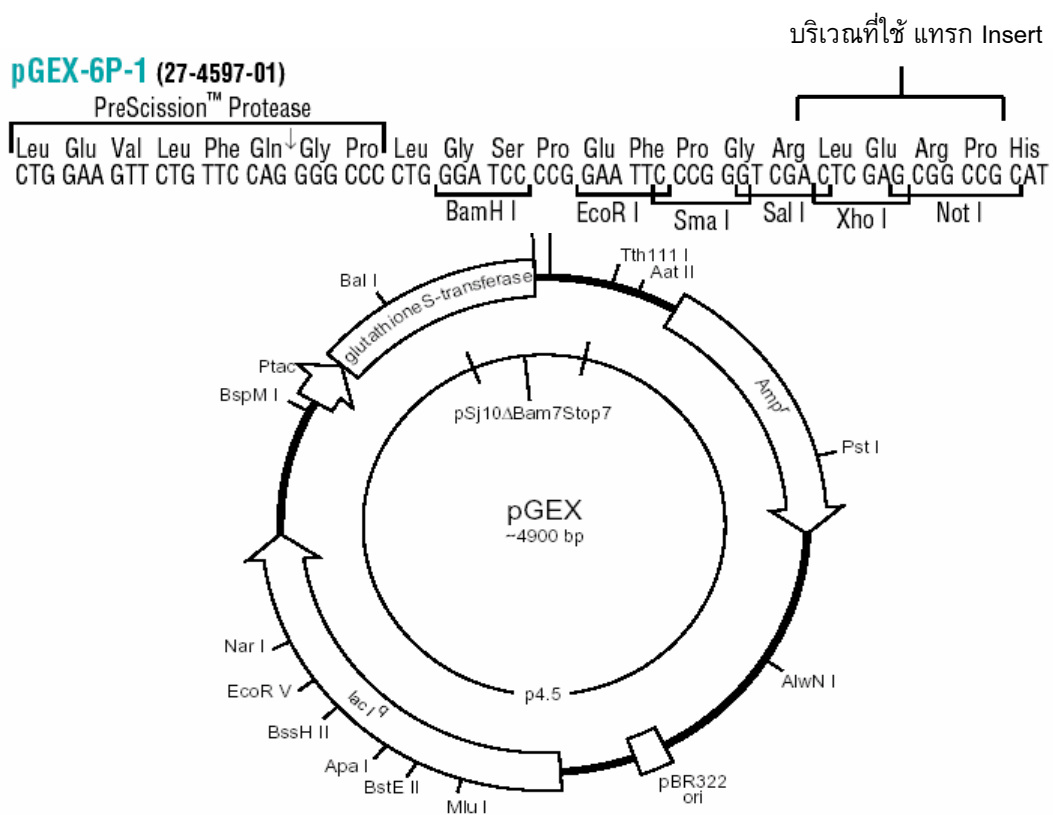
จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์แล้วมาแยกใน 1% agarose gel ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตัดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดตามที่ต้องการ นำมาสกัดด้วยชุด MinElute gel extraction kit (Qiagen) เช่นเดียวกับการสกัดผลผลิต PCR ออกจากเจลในข้อ 1.1

สำหรับ expression vector ที่ใช้ในการโคลน HPVn และ HPVc จะใช้ pGEX-6P-1 ซึ่งจะตัดด้วย *Sall* และ *NotI* ก่อนจะนำไปแยกใน 1% agarose gel ตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการและสกัดดีเอ็นเอ ออกจากเจลโดยใช้ Minelute gel extraction kit (Qiagen) เช่นกัน

ทำการโคลน HPVn และ HPVc ที่ตัดด้วย *Sall* และ *NotI* เข้ากับ pGEX-6P-1 ซึ่งถูกตัดไว้ด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase ซึ่งใช้อัตราส่วนโดยโมลของพลาสมิด : ดีเอ็นเอ เป็น 1 : 5 (Sambrook; Fritsch; & Maniatis. 2000) โดยใช้สารต่างๆ ดังตาราง 9 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

ตาราง 9 ส่วนผสมของการทำ ligation ของ HPVN หรือ HPVC กับ pGEX-6P-1 expression vector

ส่วนผสมของการ ligation	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
pGEX-6P-1 vector (10 เฟมโตโมล/ไมโครลิตร)	2
HPVN หรือ HPVC (25 เฟมโตโมล/ไมโครลิตร)	4
10X ligation buffer	1
T4 DNA Ligase (200 unit/ไมโครลิตร)	0.4
Deionized Water	2.6
ปริมาตรสุทธิ	10



ภาพประกอบ 9 โครงสร้างของ pGEX-6P-1 expression vector และตำแหน่งตัดจำเพาะของ เอนไซม์ต่างๆ (restriction sites) (Amersham)

1.5 การหาลำดับดีเอ็นเอ

นำส่วนผสมของการทำ ligation จากตาราง 9 เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue เพื่อเพิ่มจำนวนพลาสมิด สำหรับวิธีเตรียม competent cell ทำตามหนังสือ Molecular Cloning ; a laboratory manual (Sambrook; Fritsch; & Maniatis. 2000) และขั้นตอนการนำพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ทำเช่นเดียวกับการนำพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ในข้อ 1.2 แต่ใช้ยาปฏิชีวนะ ampicillin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในการคัดเลือกโคลน จากนั้นเลือกโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของ pGEX-6P-1- HPVn และ pGEX-6P-1- HPVc โดยนำโคโลนีที่เกิดขึ้น มาเลี้ยงใน LB broth ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ที่เติม ampicillin (ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) โดยเลี้ยงไว้ข้ามคืนใน incubator shaker ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 225 รอบต่อนาที จากนั้นใช้ *Sall* และ *NotI* ตัดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและวิเคราะห์บน 1% agarose โดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับการตัดผลผลิต PCR ที่โคลนอยู่ในพลาสมิด pCR[®] Blunt vector (ตาราง 7) เมื่อหาโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดได้แล้ว พลาสมิดส่วนหนึ่งจะนำไปหาลำดับดีเอ็นเอของ HPVn และ HPVc ที่ Bioservice Unit (BSU), Biotec, Thailand และวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้โปรแกรม BioEdit และ Blast เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของ ORF สำหรับการหาลำดับดีเอ็นเอจะใช้ pGEX 5' primer และ pGEX 3' primer ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้

pGEX 5' primer : 5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'

pGEX 3' primer : 5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3'

2. การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของไวรัส HPV ส่วน HPVn และ HPVc

การกระตุ้นการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนเริ่มจากการนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด HPVn และ HPVc ที่ตรวจสอบความถูกต้องของ ORF จากข้อ 1.5 เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 เช่นเดียวกับการนำพลาสมิดเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ในข้อ 1.5 จากนั้นนำ *E. coli* ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของ HPVn และ HPVc มาเลี้ยงใน LB broth 10 มิลลิลิตร (ที่มี ampicillin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรผสมอยู่) ปั่นข้ามคืนใน shaker ที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 225 รอบต่อนาที จากนั้นแบ่งเชื้อที่เตรียมไว้ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลasks ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 225 รอบต่อนาที จนมี OD ที่ 600 นาโนเมตร ประมาณ 0.5-0.7 แล้วเติม isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) ลงไปกระตุ้นโดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ แล้วนำไปเขย่าต่ออีก 4 ชั่วโมง นำเชื้อไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 x g ประมาณ 20 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่เก็บได้เติมบัฟเฟอร์ B (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl, 8 M Urea pH 8) 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเติม phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำไปทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแตกโดยใช้คลื่น

เสียงความถี่สูง (sonicate) ที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บ lysate ที่ได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส (Sambrook; Fritsch; & Maniatis. 2000)

3. การตรวจสอบหารีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน

นำ lysate ที่ได้จากข้อ 2 มาผสมกับบัฟเฟอร์ 2X SDS-treatment ในอัตราส่วน 1 : 1 แล้วต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที จากนั้นนำมาแยกด้วย 10% SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีเฉพาะพลาสมิด pGEX-6P-1 ซึ่งจะผลิตโปรตีน glutathione-S-transferase (GST) ขนาด 26 กิโลดาลตัน เป็น positive control (เพื่อดูว่าการกระตุ้นด้วย IPTG ประสบความสำเร็จหรือไม่) และ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิด เป็น negative control แยกโปรตีนโดยผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 80 โวลต์ ประมาณ 2 ชั่วโมง ย้อมเจลดด้วย Coomassie brilliant blue R-250 สังเกตแถบของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVn และ HPVc เทียบกับโปรตีนจาก *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีและไม่มีพลาสมิด pGEX-6P-1

4. การทำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVn และ HPVc ให้บริสุทธิ์

การทำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVn และ HPVc ให้บริสุทธิ์ทำได้โดยนำ lysate ที่ได้จากข้อ 2 มาแยกโดยใช้ 10% SDS-PAGE ตามขั้นตอนในข้อ 3 แล้วแช่เจล ใน 0.1M KCl ที่เย็นประมาณ 30 นาที ตัดแถบที่เป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนนำไปแช่ใน 1% SDS ข้ามคืน เก็บสารละลายที่ได้ใส่ในถุง dialysis แล้วแช่ในน้ำกลั่น เปลี่ยนน้ำกลั่นทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำให้โปรตีนเข้มข้นด้วยเครื่อง Vacuum concentrator (Speed-Vac.) ให้ได้ปริมาตรสุทธิเท่ากับปริมาตรเริ่มต้น เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส โดยส่วนหนึ่งจะนำมาใช้ในการปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาวเพื่อสร้างโมโนโคลนอลแอนติบอดีและอีกส่วนใช้สำหรับการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Hang. 2007: 24)

5. การผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HPV

5.1 การปลูกภูมิคุ้มกันหนูขาว

นำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVn และ HPVc ที่ได้จากข้อ 4 ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผสมในอัตราส่วน 1 : 1 แล้วจึงผสมกับ complete Freund's adjuvant ในอัตราส่วน 1 : 1 เช่นกัน จากนั้นนำไปฉีดเข้าช่องท้องของหนูขาว (Swiss mice) จำนวน 12 ตัว ตัวละ 100 ไมโครลิตร และทุกๆ 2 สัปดาห์ฉีดรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVn และ HPVc ผสม

กับ incomplete Freund's adjuvant โดยฉีดกระตุ้นซ้ำ 3 ครั้ง หลังจากการฉีดครั้งที่ 4 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ทำการเก็บชิ้นเนื้อแต่ละตัว นำมาทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ได้ต่อรีคอมบิแนนท์ แคปซิดโปรตีน HPVn และ HPVc โดยวิธี Western blotting และต่อเชื้อ HPV โดยวิธี immunohistochemistry เลือกหนูตัวที่ตอบสนองดีที่สุดมาฉีดด้วยรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVn และ HPVc ผสมกับ complete Freund's adjuvant อีกครั้งก่อนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา 3 วัน (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89)

5.2 การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ HPV

วิธีการผลิตเซลล์ไฮบริโดมาในการศึกษานี้ได้พัฒนามาจากวิธีการดั้งเดิม (Köhler; & Milstein. 1976: 511-519) ซึ่งดัดแปลงในปี 1979 (Mosmann; Bauman; & Williamson 1979: 511-516) โดยนำหนูที่ได้รับการปลูกภูมิคุ้มกันด้วยรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVn และ HPVc ที่ให้ผลของปฏิกิริยาระหว่างแอนติซีรัมกับแอนติเจนที่ดีที่สุดมาแยกเซลล์ม้าม แล้วนำมาหลอมรวมกับ P3X myeloma cell โดยฆ่าหนู ผ่าตัดม้ามและกระจายเซลล์ม้ามออกให้เป็นเซลล์เดี่ยวแล้วนำมาหลอมรวมกับ P3X myeloma cell line โดยใช้ 40% polyethylene glycol (PEG) หลังจากนั้นนำเซลล์ผสมมาเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ (selective medium - HAT medium) ซึ่งประกอบด้วย hypoxanthine, aminopterin, thymidine, 20% fetal calf serum ใน RPMI medium และมี 1% mouse red blood cell เป็น feeder layer ใน 96 wells microculture plate จำนวน 20 เพลต บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ภายใต้บรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ ตรวจสอบการเจริญของเซลล์ไฮบริโดมาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope นำน้ำยาเลี้ยงเซลล์จากหลุมต่างๆ ที่มีเซลล์ไฮบริโดมา ไปคัดเลือกเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HPV โดยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry

5.3 การคัดเลือกไฮบริโดมา

เนื่องจากการผลิตไฮบริโดมาที่เลี้ยงใน 96 wells microculture plate จำนวน 20 เพลต ทำให้ได้ไฮบริโดมาจำนวนมากจึงต้องคัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี dot blotting ก่อน โคลนของไฮบริโดมาที่ให้ผลบวกกับวิธี dot blotting จึงนำมาคัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี Western blotting และวิธี immunohistochemistry ต่อไป (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89)

5.3.1 การคัดเลือกขั้นที่ 1 โดยวิธี dot blotting

การใช้ pGEX-6P-1 ในการผลิตโปรตีนทำให้ได้โปรตีนลูกผสมของ GST จากพลาสมิดกับโปรตีนที่ต้องการ ดังนั้นในการคัดเลือกไฮบริโดมาด้วยวิธี dot blotting จึงต้องหยด lysate ของโปรตีนที่ได้จาก *E. coli* สายพันธุ์ BL21 3 ชนิดคือ lysate ของ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1- HPVn (HPVN), pGEX-6P-1- HPVc (HPVC) และ pGEX-6P-1 (GST) ความ

เข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ประมาณ 1 ไมโครลิตร/หยด เพื่อคัดเลือกไฮบริโดมาที่จำเพาะต่อโปรตีน HPVn และ HPVc เท่านั้น จากนั้นอบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในสารละลาย 5% blotto เป็นเวลา 5 นาที นำมาบ่มในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ จากไฮบริโดมาในแต่ละหลุม (น้ำยาเลี้ยงเซลล์เจือจาง 1:8 ใน 1% blotto = 1% non fat dry milk 0.1% tritonX 100 ละลายใน PBS) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วย PBS แล้วนำมาบ่มใน horseradish peroxidase labelled goat anti-mouse IgG heavy and light chain specific antibody (GAM-HRP ; Biorad) เจือจาง 1:1,500 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS และผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase โดยบ่มในสารละลาย substrate ประกอบด้วย 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% hydrogen peroxide, 0.05% cobalt chloride ละลายใน PBS (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548) เลือกไฮบริโดมาโคลนที่จำเพาะต่อโปรตีน HPVn หรือ HPVc แต่ไม่จำเพาะต่อ GST นำมาคัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี Western blotting และ immunohistochemistry ต่อไป

5.3.2 การคัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting

นำ lysate ของโปรตีนที่ได้จาก *E. coli* สายพันธุ์ BL21 3 ชนิดคือ lysate ของ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1- HPVn, pGEX-6P-1- HPVc และ pGEX-6P-1 มาแยกบน 10% SDS-PAGE ที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยทำเป็น 2 ส่วน นำส่วนหนึ่งของเจลนำมาย้อมโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue R-250 อีกส่วนหนึ่งนำมาถ่ายโปรตีนจากเจลลงสู่กระดาษไนโตรเซลลูโลสโดยใช้ transblot apparatus (Biorad) ผ่านกระแสไฟฟ้าที่ 50 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสแช่ใน 5% blotto เป็นเวลา 5 นาที แยกบ่มในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาแต่ละหลุมที่ผ่านการคัดเลือกโดยวิธี dot blotting แล้ว โดยเจือจาง 1:200 ใน 1% blotto ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase เช่นเดียวกับกรณีของ dot blotting เพื่อหาตำแหน่งโปรตีนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)

5.3.3 การคัดเลือกขั้นที่ 2 โดยวิธี Immunohistochemistry

นำตับกึ่งกลาดำที่ติดเชื้อ HPV และตับกึ่งกลาดำปกติแช่ใน Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดหลายๆ ครั้งเพื่อกำจัด fixative ออก นำมาผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ และไซลีน จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการ paraffin sectioning ตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นความหนา 8 ไมโครเมตร ติดบนสไลด์ที่เคลือบด้วยเจลาตินแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาผ่านกระบวนการ immunohistochemistry โดยวิธี indirect immunoperoxidase มีวิธีโดยย่อดังนี้ rehydrate เนื้อเยื่อโดยล้าง paraffin ออกจากเนื้อเยื่อด้วย xylene (deparaffination) จากนั้นผ่านลง butanol และ

แอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ จากมากไปน้อย ตรึงเนื้อเยื่อด้วยฟอร์มาลินเข้มข้น 10% ล้างด้วยน้ำกลั่นและ PBS จากนั้น block ด้วย P_1^+ (calf bovine serum เข้มข้น 10% ใน PBS) นำน้ำเลี้ยงเซลล์ไฮบริโดมาที่ต้องการทดสอบมาหยดลงบนเนื้อเยื่อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS และบ่มด้วย GAM-HRP เจือจาง 1:1,000 ใน P_1^+ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBS และบ่มในสารละลาย substrate ประกอบด้วย 0.03% DAB, 0.006% H_2O_2 ละลายใน PBS เป็นเวลา 5 นาที ย้อมซ้ำด้วย haematoxyline และ eosin Y (H & E) ตึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ จากนั้นไปมาก และ butanol ทำให้ใสใน xylene ทำเป็นสไลด์ถาวร โดยใช้ permount และปิดทับด้วย cover glass นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บริเวณที่ติดเชื้อไวรัสจะปรากฏเป็นสีน้ำตาลที่ tubular epithelial cells ของตับก้าง (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548)

โคลนของไฮบริโดมาที่มีการสร้างแอนติบอดีต่อแคปซิดโปรตีนของ HPV ที่ผ่านการคัดเลือกทั้ง 2 ชั้นจะนำมาโคลนซ้ำด้วยวิธี limited dilution (Eshhar. 1985: 1-42) จากนั้นทำการขยายเพิ่มจำนวนและเก็บเซลล์ในไนโตรเจนเหลวเพื่อเก็บไว้ใช้ต่อไป และทำการพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้

6. การพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

หลังจากทำการโคลนซ้ำไฮบริโดมาที่ผ่านการคัดเลือกเรียบร้อยแล้ว นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้มาพิสูจน์คุณสมบัติโดยการตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ ด้วยวิธี indirect ELISA การตรวจสอบ class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนด้วยวิธี sandwich ELISA และทดสอบความไวในการตรวจหรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ HPV ด้วยวิธี ด้วยวิธี dot blotting ดังต่อไปนี้

6.1 การตรวจสอบอิพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA

ทำการตรึงรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPV N และ HPV C ลงที่ก้นหลุม ELISA microtiter plate (96 หลุม) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ทั้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย blotto เข้มข้น 0.5% ปริมาตร 200 ไมโครลิตร 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที แล้วเติมสารละลาย blotto เข้มข้น 5% ทั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบ (เจือจาง 1:20 ในสารละลาย blotto เข้มข้น 5%) ลงในหลุมต่าง ๆ ของถาด 96 หลุม ดังตัวอย่างตามภาพประกอบ 10 จากนั้นทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย blotto เข้มข้น 0.5% จากนั้นเติม GAM-HRP เจือจาง 1:1,500 หลุมละ 50 ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 ชั่วโมง ล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย blotto เข้มข้น 0.5% และครั้งสุดท้ายล้างด้วย PBS เติมสารละลาย substrate ประกอบด้วย o-phenelenediamine (OPD) 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, 0.006% H_2O_2 ใน citrate buffer เข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4.5 หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม H_2SO_4 เข้มข้น 1 นอร์มอล ลงในทุกหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร โดยใช้ microplate reader (อภิรักษ์ ดันศิริสิทธิกุล. 2548: 24)

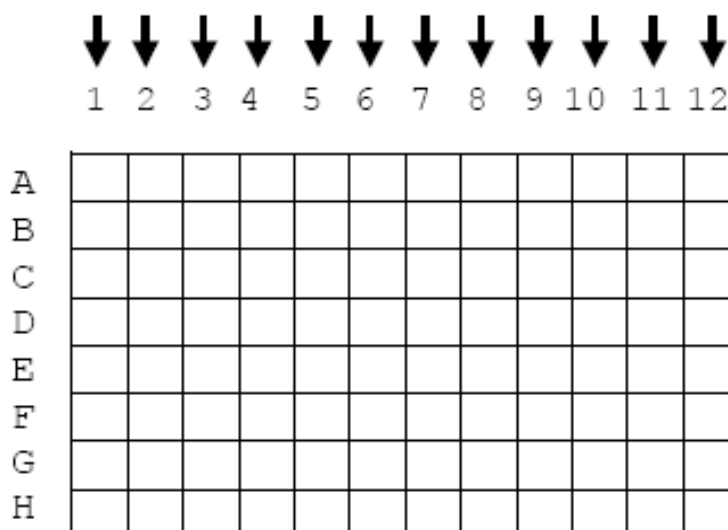
MAbs HPV	1 10-3A	2 3-3H	3 7-3D	4 13-10D	5 12-11E	6 5-7E
1 10-3A	1+1	1+2	1+3	1+4	1+5	1+6
2 3-3H		2+2	2+3	2+4	2+5	2+6
3 7-3D			3+3	3+4	3+5	3+6
4 13-10D				4+4	4+5	4+6
5 12-11E					5+5	5+6
6 5-7E						6+6

ภาพประกอบ 10 ส่วนผสมของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อแคปซิดโปรตีนของ HPV ที่ใช้ในการตรวจสอบอิพิโทปของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ (ตัวเลขแสดงถึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่างๆ)

6.2 การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

ทำการจำแนก class และ subclass ของ mouse immunoglobulin ที่สร้างจากแต่ละโคลนของไฮบริโดมาโดยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ Zymed's Mouse MonoAb ID Kit (HRP) (ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548) ดังนี้ เคลือบภาตหลุม 96 หลุมด้วย Goat anti-Mouse Ig (H+L) เข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ละลายใน PBS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง สลัดสารละลายทิ้งและล้างทุกหลุมด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที เติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่

ต้องการทดสอบแต่ละชนิดเจือจาง 1 : 20 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ลงในแต่ละคอลัมน์ตั้งแต่คอลัมน์ 1-12 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 11)



ภาพประกอบ 11 การเติมโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ต้องการทดสอบในแต่ละคอลัมน์ตั้งแต่คอลัมน์ 1-12 โดย 1 คอลัมน์ต่อโมโนโคลนอลแอนติบอดี 1 โคลน (ลูกศร)
ที่มา : อภิรักษ์ ตันศิริสิทธิกุล. (2548). การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio alginolyticus*. หน้า 76.

เมื่อครบเวลาล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที เติม Rabbit anti-isotype antibodies แต่ละชนิดเจือจาง 1 : 50 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม ลงในแต่ละแถวตั้งแต่แถว A-H บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง (ภาพประกอบ 12)

			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
IgG ₁	→	A												
IgG _{2a}	→	B												
IgG _{2b}	→	C												
IgG ₃	→	D												
IgA	→	E												
IgM	→	F												
Kappa	→	G												
Lambda	→	H												

ภาพประกอบ 12 การเติม Rabbit anti-isotype antibodies แต่ละชนิดในแต่ละแถวตั้งแต่แถว A-H (ลูกศร)
ที่มา : อภิรักษ์ ตันศิริสิทธิกุล. (2548). การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio alginolyticus*. หน้า 76.

จากนั้นล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้ง ละครึ่ง 10 นาที แล้วเติม HRP-Goat anti-Rabbit IgG (H+L) เจือจาง 1 : 1,500 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย 0.5% blotto ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 4 ครั้ง ละครึ่ง 10 นาที และผ่านกระบวนการ immunoperoxidase เช่นเดียวกับกรณีของการตรวจสอบอีพีโทป

6.3 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจหาโรคคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของ HPV ด้วยวิธี dot blotting

นำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVn และ HPVc มาทำการเจือจางแบบ 2 fold serial dilution ความเข้มข้น 200 ถึง 0.781 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ด้วย PBS แล้วหยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสเช่นเดียวกับวิธี dot blotting จากนั้นบ่มกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีแต่ละโคลนโดยเจือจาง 1:200 ใน 1% blotto ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และผ่านกระบวนการ indirect immunoperoxidase ตรวจดูระดับความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVn และ HPVc ที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำปฏิกิริยากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า

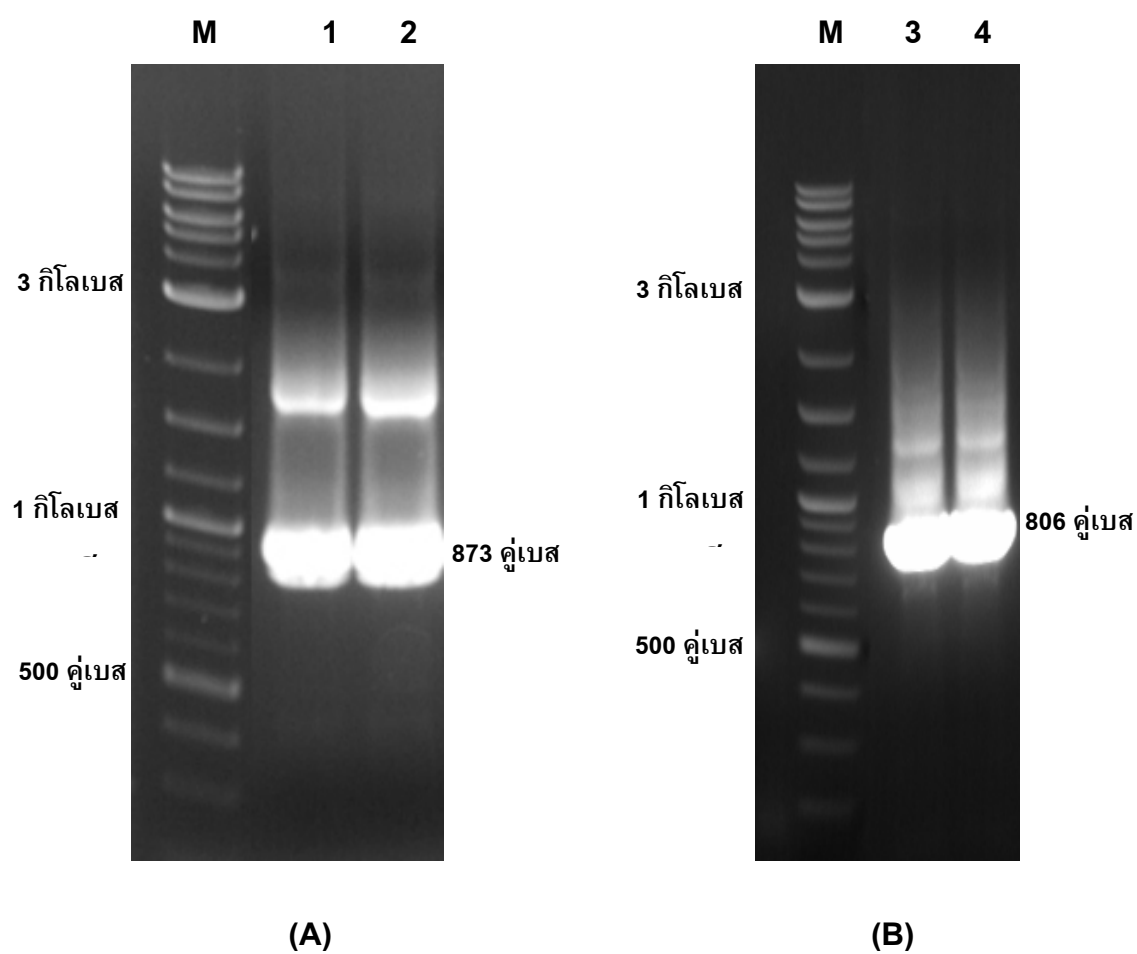
บทที่ 4

ผลการทดลอง

การสังเคราะห์ยีนแคปซิดโปรตีนและการโคลนส่วนที่เป็นรหัสทางด้านปลาย N (HPVN) และปลาย C (HPVC) ของแคปซิดโปรตีนของเชื้อ HPV

จากการนำดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อมาทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีน HPVN และ HPVC ด้วยเอนไซม์ *Pfx* DNA polymerase พบว่าผลผลิต PCR ของ HPVN และ HPVC มีขนาด 873 และ 806 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพประกอบ 13) โดยปลายของผลผลิต PCR ทั้งสองเป็นแบบปลายทู่ (blunt end) จากนั้นทำการโคลนเข้าสู่พลาสมิด pCR Blunt แล้วนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดไปตรวจสอบการมีอยู่ของ insert โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sall* และ *NotI* ซึ่งออกแบบอยู่ทางปลาย 5' ของ primer โดยจะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3.5 กิโลเบส ของ พลาสมิด pCR Blunt และชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 873 และ 806 คู่เบส ของ HPVN และ HPVC ตามลำดับ (ภาพประกอบ 14) ทำการโคลนชิ้นดีเอ็นเอของ HPVN และ HPVC เข้าสู่พลาสมิด pGEX-6P-1 ซึ่งเป็นพลาสมิดที่ใช้สำหรับการกระตุ้นการแสดงออกของยีน คัดเลือกโคลนที่มีการเชื่อมต่อของ HPVN และ HPVC โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sall* และ *NotI* จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 4.9 กิโลเบส ของพลาสมิด pGEX-6P-1 และชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 873 และ 806 คู่เบส ของ HPVN และ HPVC ตามลำดับ (ภาพประกอบ 15)

จากการตรวจสอบลำดับเบสของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด HPVN และ HPVC พบว่าพลาสมิดที่ได้มีการเชื่อมต่อในตำแหน่งที่ถูกต้องและลำดับดีเอ็นเอของ HPVN และ HPVC มีความเหมือนกับยีนแคปซิดโปรตีนของเชื้อ HPV (Genbank accession no: DQ002873) โดยมี percent identity เท่ากับ 100 จากนั้นจึงนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1-HPVN และ pGEX-6P-1-HPVC ไป transform เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 เพื่อกระตุ้นให้แบคทีเรียสร้างโปรตีน HPVN และ HPVC ต่อไป

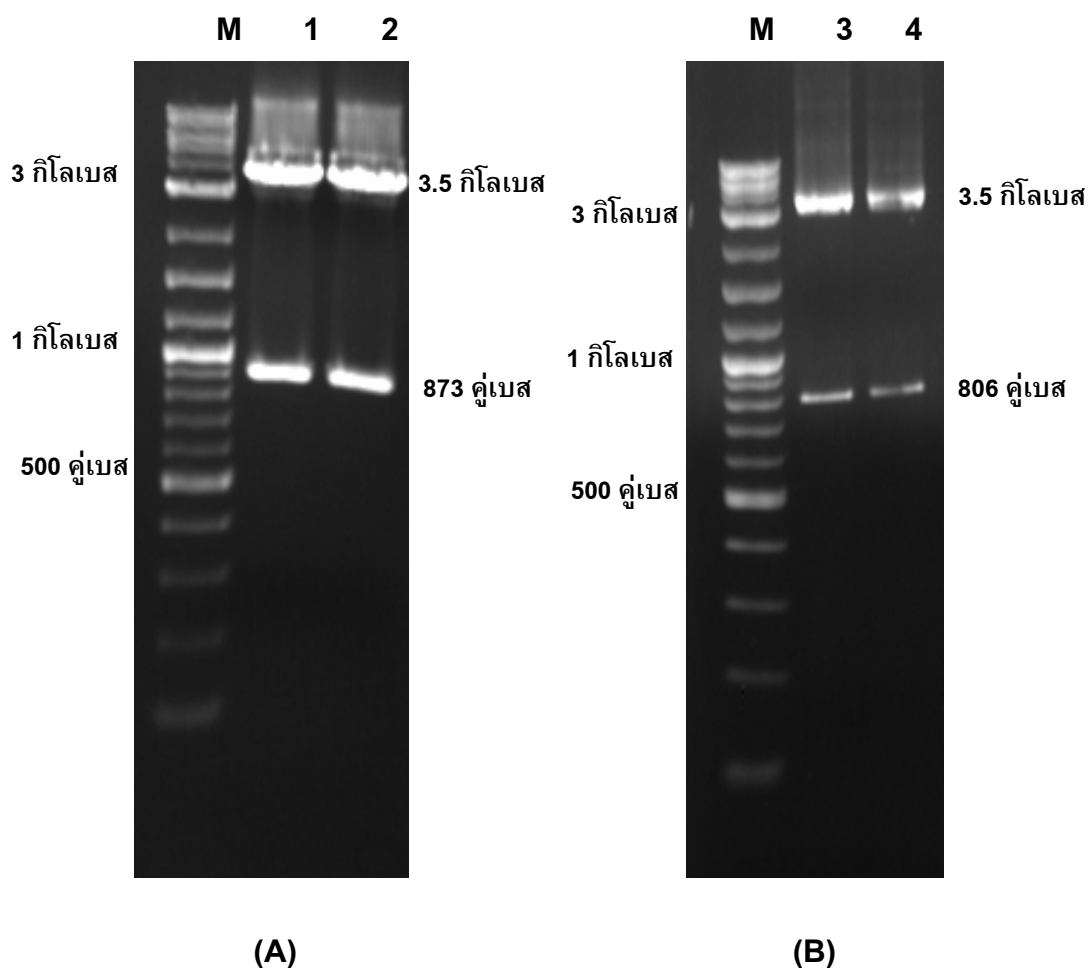


ภาพประกอบ 13 ผลผลิต PCR ของ HPVn และ HPVc

(A) คอลัมน์ที่ 1 และ 2 ผลผลิต PCR ของ HPVn ขนาด 873 คู่เบส

(B) คอลัมน์ที่ 3 และ 4 ผลผลิต PCR ของ HPVc ขนาด 806 คู่เบส

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (2-log DNA ladder)

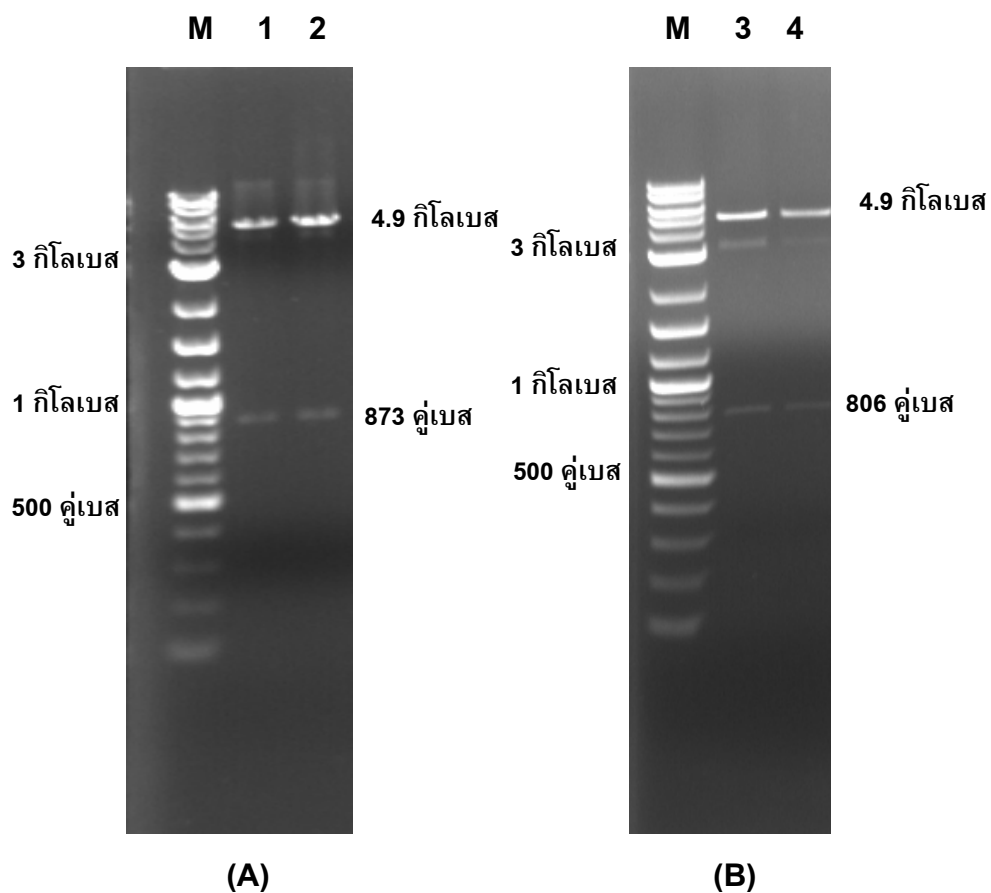


ภาพประกอบ 14 การวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCR-Blunt โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sall* และ *NotI*

(A) คอลัมน์ที่ 1 และ 2 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCR-Blunt-HPVN โดยพลาสมิด pCR Blunt มีขนาดประมาณ 3.5 กิโลเบส ส่วน HPVN ขนาด 873 คู่เบส

(B) คอลัมน์ที่ 3 และ 4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCR-Blunt-HPVC โดยพลาสมิด pCR Blunt มีขนาดประมาณ 3.5 กิโลเบส ส่วน HPVC ขนาด 806 คู่เบส

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (2-log DNA ladder)



ภาพประกอบ 15 การวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัด

จำเพาะ *SalI* และ *NotI*

(A) คอลัมน์ที่ 1 และ 2 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1- HPVn โดยพลาสมิด

pGEX-6P-1 มีขนาดประมาณ 4.9 กิโลเบส ส่วน HPVn ขนาด 873 คู่เบส

(B) คอลัมน์ที่ 3 และ 4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1- HPVc โดยพลาสมิด

pGEX-6P-1 มีขนาดประมาณ 4.9 กิโลเบส ส่วน HPVc ขนาด 806 คู่เบส

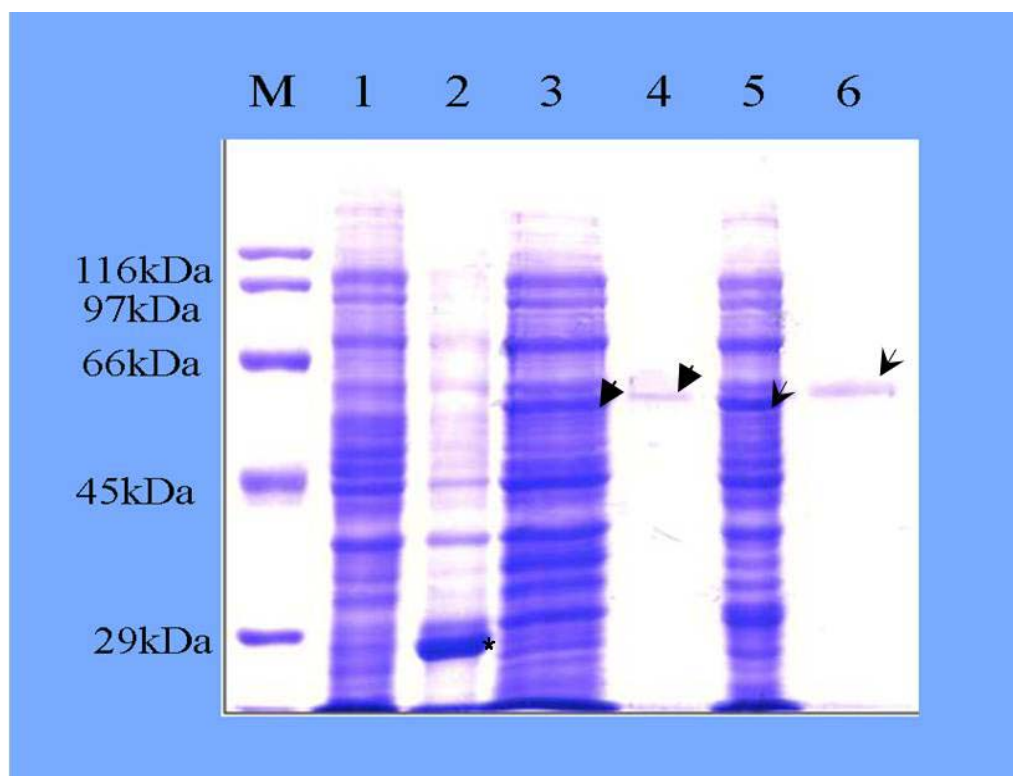
M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (2-log DNA ladder)

การกระตุ้นการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนของไวรัส HPV ส่วนปลาย N (HPVN) และ ปลาย C (HPVC)

เมื่อคัดเลือก *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1-HPVN และ pGEX-6P-1-HPVC ได้แล้ว นำมากระตุ้นให้แบคทีเรียสร้างโปรตีน HPVN และ HPVC โดยใช้ 1mM IPTG ซึ่งทำหน้าที่เป็น inducer ของ *tac* promoter จากนั้นเก็บเซลล์แบคทีเรียมาทำให้ผนังเซลล์แตกและวิเคราะห์โดยแยกบน SDS-PAGE พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVN และ HPVC ซึ่งมีขนาดประมาณ 57.2 และ 56.7 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (ภาพประกอบ 16 คอลัมน์ที่ 3 และ 5) ซึ่งรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่ได้จะมีโปรตีน GST เชื่อมอยู่ทางปลาย N โดยเทียบกับ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิด และ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1 ซึ่งจะมีการแสดงออกของโปรตีน GST ขนาด 26 กิโลดาลตัน

การทำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVN และ HPVC ให้บริสุทธิ์

จากการทำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVN และ HPVC ให้บริสุทธิ์โดยนำ lysate ของแบคทีเรีย มาแยกด้วย 10% SDS-PAGE และแช่เจลใน 0.1M KCl จะเห็นแถบโปรตีนเป็นสีขาวขุ่น จากนั้นตัดแถบรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVN และ HPVC มาแยกโปรตีนออกจากเจลโดยแช่เจลใน 1% SDS และนำมา dialysis ในน้ำกลั่น พบว่าสามารถแยกได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูง เมื่อนำมาทดสอบด้วย 10 % SDS-PAGE ไม่พบแถบโปรตีนอื่นๆ นอกจากรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่ต้องการซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน HPVN เท่ากับ 57.2 กิโลดาลตัน และ โปรตีน HPVC เท่ากับ 56.7 กิโลดาลตัน (ภาพประกอบ 16 คอลัมน์ที่ 4 และ 6)



ภาพประกอบ 16 การตรวจสอบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีน HPVN และ HPVC

โดยนำมาแยกใน 10% SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250

คอลัมน์ที่ 1 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิด

คอลัมน์ที่ 2 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1

คอลัมน์ที่ 3 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด
pGEX-6P-1-HPVN

คอลัมน์ที่ 4 รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVN ที่ทำให้บริสุทธิ์

คอลัมน์ที่ 5 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด
pGEX-6P-1-HPVC

คอลัมน์ที่ 6 รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVC ที่ทำให้บริสุทธิ์

โดย M คือ โปรตีนมาตรฐาน

* คือ โปรตีน GST ขนาด 26 กิโลดาลตัน

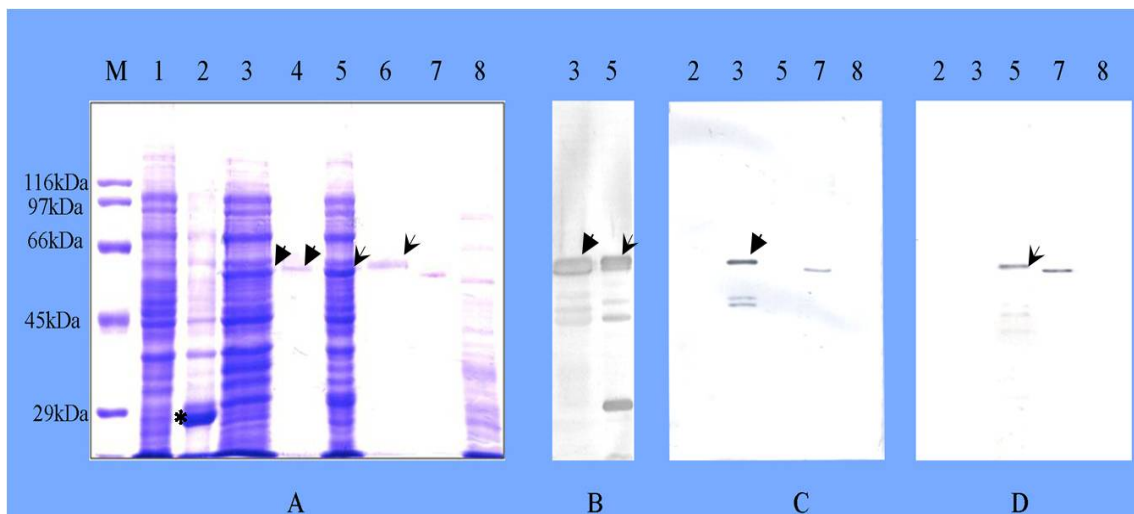
➡ คือ รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVN ขนาดประมาณ 57.2 กิโลดาลตัน

⬅ คือ รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVC ขนาดประมาณ 56.7 กิโลดาลตัน

การผลิตและการคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HPV

นำรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVN และ HPVC ที่ทำให้บริสุทธิ์มาฉีดให้หนูขาว จำนวน 12 ตัว พบว่าหนูขาวสามารถตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVN และ HPVC ได้ทุกตัวในระดับที่แตกต่างกัน โดยโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ได้มีความจำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVN และ HPVC และสามารถจับกับโปรตีนขนาดเล็กกว่าแถบรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVN และ HPVC จำนวนมาก (ภาพประกอบ 17B) คาดว่าอาจเกิดจากการสลายของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVN และ HPVC ในระหว่างการเตรียมโปรตีน จึงเลือกหนูตัวที่ตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVN และ HPVC จากวิธี Western blotting และต่อเชื้อ HPV จากวิธี immunohistochemistry ที่ดีที่สุด มาฉีดด้วยรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVN และ HPVC ผสมกับ complete Freund's adjuvant อีกครั้งก่อนการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา 3 วัน จากการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีสามารถคัดเลือกโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ HPVN จำนวน 4 โคลน และจำเพาะต่อ HPVC จำนวน 2 โคลน (ตาราง 10) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ได้สามารถจับกับเชื้อ HPV บริสุทธิ์ได้ด้วยวิธี Western blotting (ภาพประกอบ 17C และ D คอลัมน์ที่ 7) และ dot blotting (ภาพประกอบ 18) สำหรับการตรวจเชื้อ HPV ในเนื้อเยื่อตับกึ่งกลาดำโดยวิธี immunohistochemistry พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ HPVN สามารถจับกับ inclusion bodies ในนิวเคลียสของเซลล์ตับกึ่งที่ติดเชื้อได้โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบต่าง ๆ ในเนื้อเยื่อตับกึ่งกลาดำปกติ (ภาพประกอบ 19) ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV3-3H, HPV7-3D และ HPV10-3A สามารถจับกับ inclusion bodies ได้ชัดเจนมาก และโมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV13-10D สามารถจับกับ inclusion bodies ได้ชัดเจน ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อ HPVC ทั้ง 2 โคลน ไม่สามารถจับกับ inclusion bodies ได้ (ตาราง 10)

เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากการใช้เชื้อ HPV บริสุทธิ์ที่แยกจากตับกึ่งกลาดำทั้ง 4 โคลน (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89) มาทำ Western blotting กับรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVN และ HPVC รวมถึงเชื้อ HPV บริสุทธิ์เพื่อเปรียบเทียบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 โคลนจะจับกับรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVN และเชื้อ HPV บริสุทธิ์เท่านั้น (ภาพประกอบ 20)



ภาพประกอบ 17 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีชนิดต่างๆ โดยวิธี SDS-PAGE (A) และ Western blotting (B-D) โดยแยกโปรตีนด้วย (A) 10% SDS-PAGE และย้อมเจลด้วย Coomassie Brilliant blue R-250 เจลอีกส่วนนำมาทำ Western blotting โดยทดสอบกับ (B) โพลีโคลนอลแอนติบอดีของหนูที่มีความจำเพาะต่อ HPVn และ HPVc (C) โมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV3-3H ที่มีความจำเพาะต่อ HPVn และ (D) โมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV12-11E ที่มีความจำเพาะต่อ HPVc ตามลำดับ โดย

คอลัมน์ที่ 1 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิด

คอลัมน์ที่ 2 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1

คอลัมน์ที่ 3 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มี pGEX-6P-1-HPVn

คอลัมน์ที่ 4 รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVn ที่ทำให้บริสุทธิ์

คอลัมน์ที่ 5 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มี pGEX-6P-1-HPVc

คอลัมน์ที่ 6 รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVc ที่ทำให้บริสุทธิ์

คอลัมน์ที่ 7 เซื้อ HPV บริสุทธิ์

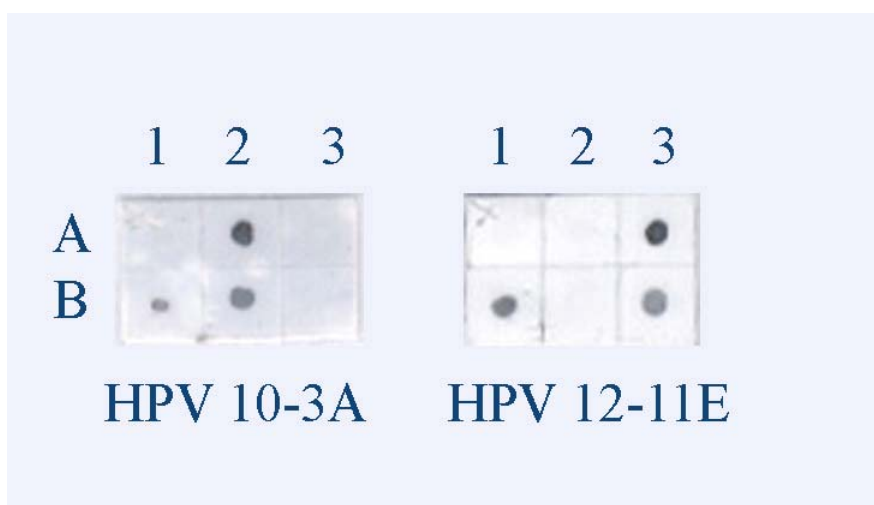
คอลัมน์ที่ 8 โปรตีนตับของกิ้งกูด้าปกติ

โดย M คือ โปรตีนมาตรฐาน

* คือ โปรตีน GST ขนาด 26 กิโลดาลตัน

➤ คือ รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVn ขนาดประมาณ 57.2 กิโลดาลตัน

➤ คือ รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVc ขนาดประมาณ 56.7 กิโลดาลตัน



ภาพประกอบ 18 การทดสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ HPV ด้วยวิธี dot blotting โดยหยดโปรตีนชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ประมาณ 1 ไมโครลิตร/หยด ดังนี้

แถว A (1) lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1

(2) lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1-HPVN

(3) lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pGEX-6P-1-HPVC

แถว B (1) เชื้อ HPV บริสุทธิ์

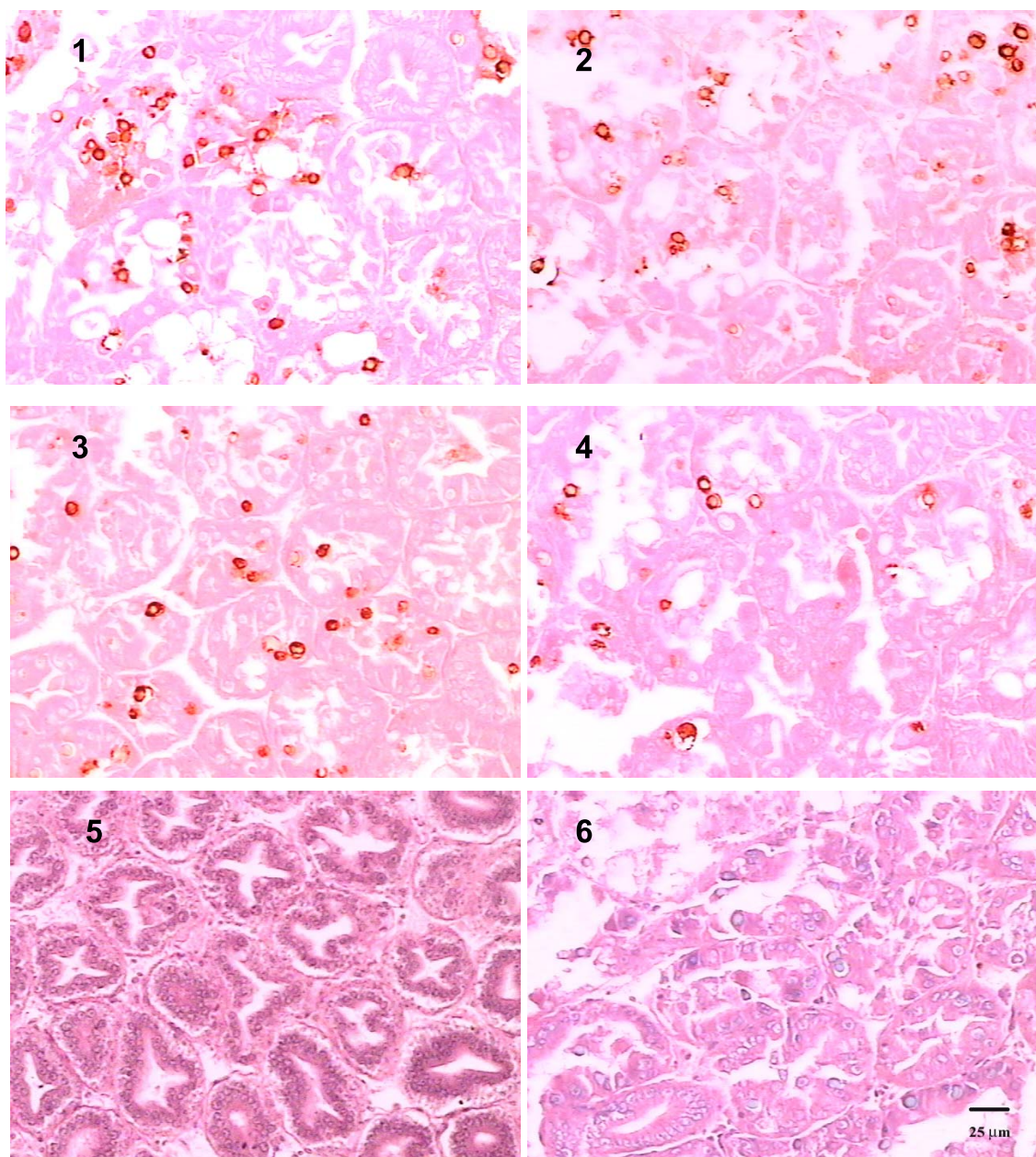
(2) รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVN ที่ทำให้บริสุทธิ์

(3) รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVC ที่ทำให้บริสุทธิ์

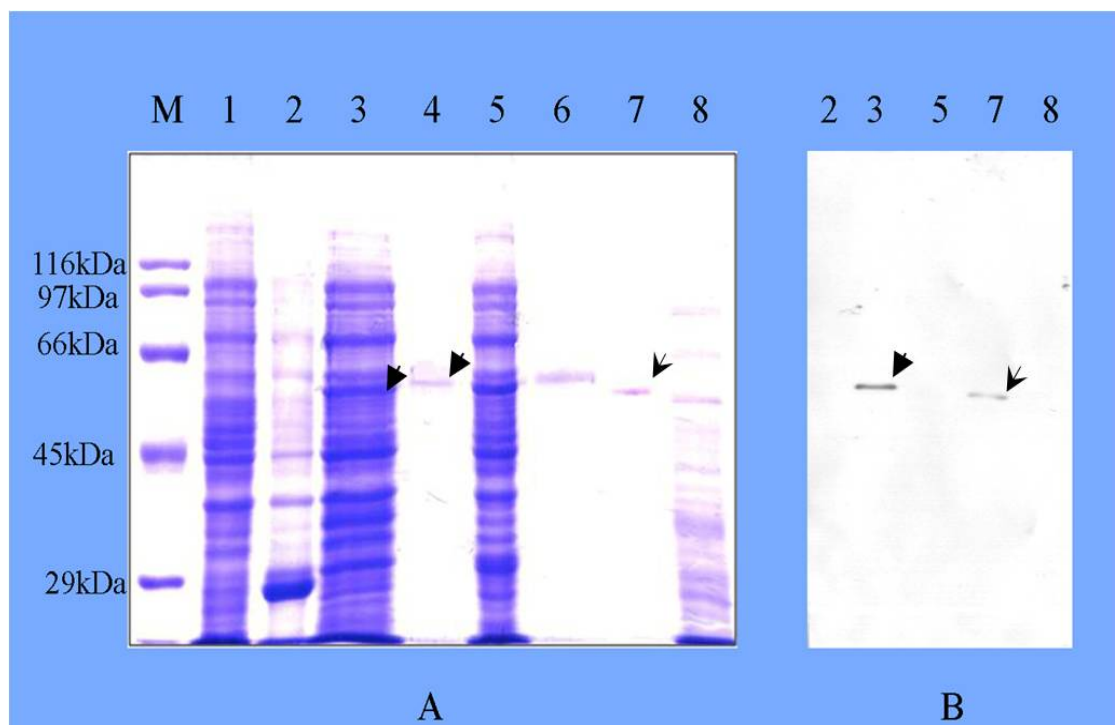
ตาราง 10 โคลนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVN และ HPVC, class, ความจำเพาะและความไวของการตรวจหาแอนติเจนของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ทดสอบโดยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry

MAbs (class)	โปรตีน ที่จับ	ความไวของการ ตรวจหาแอนติเจนโดย วิธี dot blotting (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	การตรวจหา แอนติเจนโดยวิธี Western blotting (เชื้อ HPV บริสุทธิ์)	IHC
HPV3-3H, HPV10-3A (IgG _{2a})	HPVN	3.125	+++	+++
HPV7-3D (IgG _{2b})	HPVN	3.125	+++	+++
HPV13-10D (IgG _{2a})	HPVN	100	+	++
HPV5-7E, HPV12-11E (IgG _{2a})	HPVC	3.125	+++	-

หมายเหตุ	-	โมโนโคลนอลแอนติบอดีไม่สามารถจับกับโปรตีนหรือเชื้อ HPV ได้
	+	โมโนโคลนอลแอนติบอดีจับกับโปรตีนหรือเชื้อ HPV ได้เล็กน้อย
	++	โมโนโคลนอลแอนติบอดีจับกับโปรตีนหรือเชื้อ HPV ได้ชัดเจน
	+++	โมโนโคลนอลแอนติบอดีจับกับโปรตีนหรือเชื้อ HPV ได้ชัดเจนมาก
IHC		immunohistochemistry
MAbs		โมโนโคลนอลแอนติบอดี



ภาพประกอบ 19 การตรวจการติดเชื้อ HPV ภายใน hepatopancreatic tubule epithelial cells ของกุ้งกุลาดำด้วยวิธี immunohistochemistry โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (1) HPV3-3H (2) HPV7-3D (3) HPV10-3A และ (4) HPV13-10D ซึ่งจะพบ immunoreactivity บริเวณ inclusion bodies (5) ตับของกุ้งกุลาดำปกติที่ใส่โมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV3-3H และย้อม haematoxylin และ eosin Y ซึ่งไม่พบ immunoreactivity และ (6) ตับกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ HPV ย้อมด้วย haematoxylin และ eosin Y พบ inclusion bodies ติดสี basophilic



ภาพประกอบ 20 การตรวจสอบความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blotting โดยแยกโปรตีนชนิดต่างๆ ด้วย (A) 10% SDS-PAGE ย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250 และนำเจลอีกส่วนมาทำ (B) Western blotting แล้วทดสอบโดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV16-9C (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89)

คอลัมน์ที่ 1 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่ไม่มีพลาสมิด

คอลัมน์ที่ 2 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มีพลาสมิด pGEX-6P-1

คอลัมน์ที่ 3 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มี pGEX-6P-1-HPVN

คอลัมน์ที่ 4 รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVN ที่ทำให้บริสุทธิ์

คอลัมน์ที่ 5 lysate ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ที่มี pGEX-6P-1-HPVC

คอลัมน์ที่ 6 รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVC ที่ทำให้บริสุทธิ์

คอลัมน์ที่ 7 เซื้อ HPV บริสุทธิ์

คอลัมน์ที่ 8 โปรตีนตับกึ่งของกุลาดำปกติ

M คือ โปรตีนมาตรฐาน

➤ คือ เซื้อ HPV บริสุทธิ์

➤ คือ รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVN ขนาดประมาณ 57.2 กิโลดาลตัน

การพิสูจน์คุณสมบัติของโมโนโคลนอลแอนติบอดี

จากการตรวจสอบอีพิโทปของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีด้วยวิธี indirect ELISA พบว่า เมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ HPV N แต่ละชนิดมาผสมรวมกัน (combine) สามารถแบ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกเป็น 2 กลุ่มคือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 1 (HPV 10-3A, HPV 3-3H และ 13-10D) มีความจำเพาะต่ออีพิโทปเดียวกันเนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีมีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่ไม่ได้ผสมรวมกัน แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีจับกับอีพิโทปของแอนติเจนที่ตำแหน่งเดียวกันหรือคาบเกี่ยวกัน ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 2 (HPV7-3D) จับกับแอนติเจนคนละอีพิโทปเนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีมีการเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่ไม่ได้ผสมรวมกัน และเมื่อนำโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ HPV C มาผสมรวมกันสามารถแบ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีออกเป็น 2 กลุ่มคือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มที่ 3 (HPV5-7E) และ 4 (HPV12-11E) เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยามีค่าเพิ่มสูงขึ้นซึ่งแสดงให้เห็นว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีนี้จับกับอีพิโทปของแอนติเจนในตำแหน่งที่ต่างกัน (ภาพประกอบ 21)

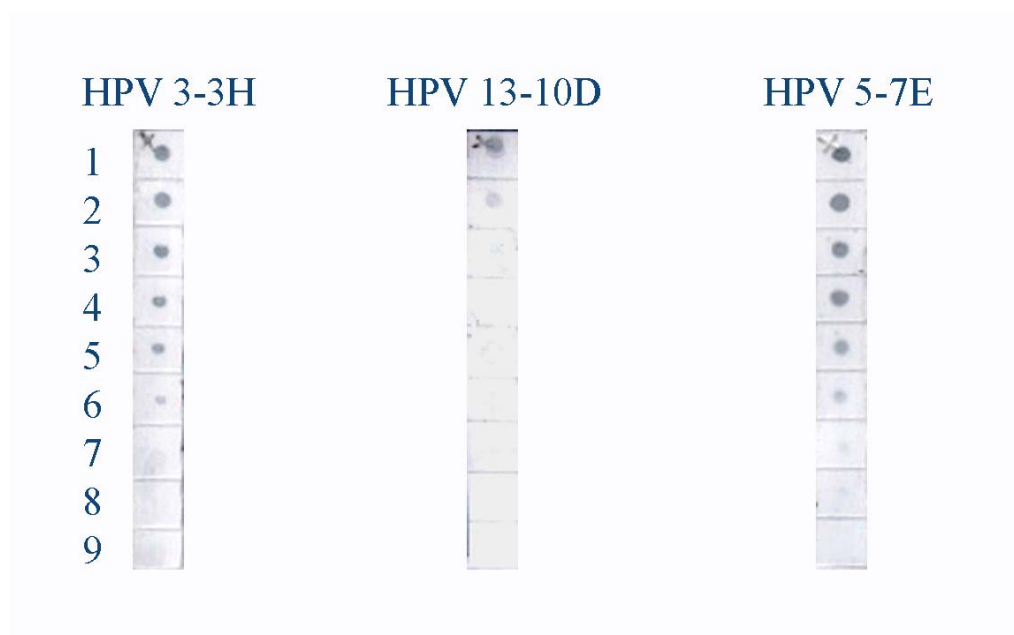
—————กลุ่มที่ 1————— | กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่ 3 กลุ่มที่ 4

MAbs HPV	10-3A	3-3H	13-10D	7-3D	12-11E	5-7E
10-3A	0.782 ⁽¹⁾	0.833	0.789	0.802		
3-3H		0.830 ⁽¹⁾	0.804	0.840		
13-10D			0.648 ⁽¹⁾	0.811		
7-3D				0.766 ⁽²⁾		
12-11E					0.299 ⁽³⁾	0.439
5-7E						0.345 ⁽⁴⁾

ภาพประกอบ 21 ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการตรวจสอบอิมูโนโพรบของแอนติเจนที่จับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีโคลนต่าง ๆ (ตัวเลขเหนือค่า OD คือ โมโนโคลนอลแอนติบอดีกลุ่มต่าง ๆ)

การจำแนก class และ subclass ของโมโนโคลนอลแอนติบอดีโดยวิธี sandwich ELISA โดยใช้ Zymed's Mouse MonoAb ID Kit (HRP) พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 6 โคลนที่ผลิตได้มี class เป็น IgG_{2a} และ IgG_{2b} และ subclass เป็น kappa (K) (ตาราง 10)

การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการจับกับรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVn และ HPVc โดยวิธี dot blotting พบว่า โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้สามารถใช้ในการตรวจหารีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนด้วยความไวในระดับที่แตกต่างกันตั้งแต่ 200 ถึง 3.125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกโคลนสามารถตรวจหารีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนที่ระดับความเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ยกเว้นโมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV13-10D มีความไวต่ำที่สุด สามารถตรวจหารีคอมบิแนนท์แคปซิดที่ระดับโปรตีนเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ตาราง 10 และภาพประกอบ 22)



ภาพประกอบ 22 การทดสอบความไวของโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิดต่างๆ ในการจับกับรีคอม-

บิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVn และ HPVc ด้วยวิธี dot blotting โดยหยดรีคอมบิแนนท์
แคปซิดโปรตีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันดังนี้

แถวที่ 1 รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

แถวที่ 2 รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

แถวที่ 3 รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

แถวที่ 4 รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

แถวที่ 5 รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนเข้มข้น 12.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

แถวที่ 6 รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนเข้มข้น 6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

แถวที่ 7 รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

แถวที่ 8 รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนเข้มข้น 1.56 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

แถวที่ 9 รีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนเข้มข้น 0.781 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

บทที่ 5

สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

จากการทดลองเบื้องต้นได้ออกแบบ primer สำหรับเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีนของไวรัส HPV ทั้งยีน พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีนและสามารถนำเข้าสู่ pGEX-6P-1 expression vector ได้ แต่ไม่พบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีนเมื่อกระตุ้นด้วย IPTG ทั้งนี้อาจเกิดจากรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้มีขนาดใหญ่เกินไป ดังนั้นจึงได้ออกแบบ primer สำหรับเพิ่มจำนวนยีนแคปซิดโปรตีนของไวรัส HPV โดยแบ่งยีนออกเป็นสองส่วนคือ ส่วนที่เป็นรหัสทางด้านปลาย N (HPVN) และปลาย C (HPVC) ซึ่งเมื่อโคลนยีนและกระตุ้นการแสดงออกของแคปซิดโปรตีนของเชื้อ HPV สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVN และ HPVC จาก *E. coli* สายพันธุ์ BL21 โดยได้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 57.2 และ 56.7 กิโลดาลตัน ตามลำดับ และสามารถแยกโปรตีน HPVN และ HPVC ได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูงโดยไม่พบแถบของโปรตีนอื่นๆ เมื่อนำโปรตีนที่ได้มาฉีดให้หนูขาวจำนวน 12 ตัว พบว่าหนูขาวสามารถตอบสนองต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVN และ HPVC ได้ทุกตัว จึงเลือกหนูที่ตอบสนองดีที่สุดที่สุดมาผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งสามารถผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ HPVN จำนวน 4 โคลน และจำเพาะต่อ HPVC จำนวน 2 โคลนซึ่งทั้ง 6 โคลน มี class เป็น IgG และ subclass เป็น kappa (K) โมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้สามารถจับกับเชื้อ HPV บริสุทธิ์ที่แยกได้จากกึ่งที่ติดเชื้อตามธรรมชาติได้ด้วยวิธี dot blotting และ Western blotting จึงสามารถนำไปใช้ในการตรวจการติดเชื้อ HPV ด้วยวิธีดังกล่าวได้อย่างดี สำหรับการตรวจเชื้อ HPV ในเนื้อเยื่อตับของกึ่งกุลาดำโดยวิธี immunohistochemistry พบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HPVN สามารถจับกับ inclusion bodies ในนิวเคลียสของเซลล์ตับกึ่งที่ติดเชื้อได้โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบต่าง ๆ ในเนื้อเยื่อตับกึ่งกุลาดำปกติ ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีเหล่านี้จึงสามารถใช้ตรวจการติดเชื้อโดยวิธี immunohistochemistry ได้ดี สำหรับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HPVC นั้นไม่สามารถจับกับ inclusion bodies ได้เมื่อใช้วิธี immunohistochemistry อาจเนื่องมาจากอิพิโทปในส่วนของปลาย C ของแคปซิดโปรตีนอาจพบบ่อยภายในโมเลกุลของโปรตีน ทำให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HPVN เท่านั้นที่จับกับ inclusion bodies ได้ ซึ่งสอดคล้องกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีทั้ง 4 โคลน ที่ผลิตจากการใช้เชื้อ HPV ที่แยกจากกึ่งกุลาดำเป็นแอนติเจนโดยจะมีความจำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์แคปซิดโปรตีน HPVN และเชื้อ HPV บริสุทธิ์เท่านั้น (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89)

อย่างไรก็ตามโมโนโคลนอลแอนติบอดีทุกโคลนที่ผลิตได้รวมถึงโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากการใช้เชื้อ HPV ที่แยกจากกึ่งกุลาดำเป็นแอนติเจน (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89) สามารถจับกับ inclusion bodies ภายใน tubule epithelial cells จากเซลล์ตับกึ่งได้ในบางกรณีเท่านั้น ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับวิธี *in situ* hybridization โดยใช้ genomic DNA ของ HPV เป็น probe

(Sukhumsirichart, et al. 1999: 1-10) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอนุภาคของไวรัสภายใน inclusion bodies มีความหนาแน่นมากทำให้บริเวณของอีพิโทปที่ถูกจับโดยโมโนโคลนอลแอนติบอดีถูกบังทำให้โมโนโคลนอลแอนติบอดีไม่สามารถจับกับบริเวณของอีพิโทปของอนุภาคไวรัสได้หรืออาจเกิดจาก กุ้งติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นที่มีการแสดงออกของโรคคล้ายกับไวรัส HPV (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89) นอกจากนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ (ยกเว้น HPV13-10D) มีความไวในการ ตรวจหาโรคอมบิแวนท์แคปซิดโปรตีนเท่ากับโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตจากการใช้เชื้อ HPV เป็นแอนติเจน (Rukpratanporn; et al. 2005: 85-89) คือสามารถตรวจหาโรคอมบิแวนท์แคปซิด โปรตีนที่ระดับความเข้มข้น 3.125 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ยกเว้นโมโนโคลนอลแอนติบอดี HPV6-12B (Rukpratanporn, et al. 2005: 85-89) สามารถตรวจหาโรคอมบิแวนท์แคปซิดโปรตีนที่ระดับความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

จากการศึกษานี้พบว่าการใช้โรคอมบิแวนท์แคปซิดโปรตีนของไวรัส HPV เป็นแอนติเจน เพื่อใช้ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีประโยชน์อย่างมากเนื่องจากสามารถผลิตโปรตีนได้ตามต้องการโดยไม่จำเป็นต้องแยกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์จากตับของกุ้งที่ติดเชื้อและช่วยลดปัญหาการ เกิดปฏิกิริยาข้ามกับองค์ประกอบต่าง ๆ ในเนื้อเยื่อตับของกุ้งกุลาดำ นอกจากนี้ยังสามารถนำ โรคอมบิแวนท์แคปซิดโปรตีนนี้ไปฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันกระต่ายเพื่อใช้ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี ต่อไป จากการศึกษานี้พบว่าสามารถใช้ประโยชน์จากโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้นำมาใช้ ตรวจโรคกุ้งแคระในกุ้งกุลาดำด้วยวิธี dot blotting, Western blotting และ immunohistochemistry ได้ นอกจากนี้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้อาจนำไปใช้ตรวจมูลของกุ้งที่ยังมีชีวิตอยู่โดยไม่ต้องทำ ให้กุ้งตายเช่นเดียวกับวิธี PCR (Pantoja; & Lightner. 2000: 177-182) และคาดว่าจะสามารถ พัฒนาชุดตรวจไวรัสแบบง่าย เช่น strip test เช่นเดียวกับชุดตรวจการตั้งครรภ์ ใช้งานง่ายและ รวดเร็วต่อไป

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- กุ้งกุลาดำ. (ม.ม.ป) สืบค้นเมื่อ 10 กันยายน 2550, จาก <http://encyclopedia.learn.in.th/content.php?encid=52>
- มหาวิทยาลัยมหิดล. คณะวิทยาศาสตร์. (2549). งานวิจัยในเรื่องกุ้งกุลาดำ. สืบค้นเมื่อ 10 กันยายน 2550, จาก <http://sc.mahidol.ac.th/tha/award/ttsf43.htm>
- วิจิตรา วรณโฆหาร; และคนอื่นๆ. (2545). การสำรวจความชุกของโรค Hepatopancreatic parvovirus (HPV) ในกุ้งกุลาดำระยะวัยอ่อนโดยวิธีการย้อมด้วยสารมาลาไคล์กรีน ความเข้มข้น 0.1%. ใน การประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 28.
- สิริ ทุกขวินาศ; และ ชุตติมา ขมวิลัย. (2545, พฤษภาคม-มิถุนายน). แนวทางการวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมกุ้งของประเทศไทย. วารสารการประมง. สืบค้นเมื่อ 10 กันยายน 2550, จาก http://nicaonline.com/articles2/site/view_article.asp?idarticle=122
- สุทธิพันธ์ สารสมบัติ; และคนอื่นๆ. (2537). อิมมูโนวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: เค.พี. พรินต์ติ้ง
- อภิรักษ์ ตันศิริสิทธิกุล. (2548). การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ *Vibrio alginolyticus*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.
- ไพศาล สิทธิกรกุล. (2548). วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จัดทำขึ้นสำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.
- Bachere, E. (2000). Introduction shrimp immunity and disease control. *Aquaculture*. 191: 3-11.
- Bonami, J. R.; et al. (1995). Characterization of Hepatopancreatic parvo-like virus, a second unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps. *Journal of General Virology*. 76: 813-817.
- Catap, E. S.; et al. (2003). Occurrence, histopathology and experimental transmission of Hepatopancreatic parvovirus (HPV) infections in *Penaeus monodon* postlarvae. *Diseases of Aquatic Organisms*. 57: 11-17.
- Chong, Y. C.; & Loh, H. (1984). Hepatopancreas chlamydial and parvoviral infections of farmed marine prawns in Singapore. *Singap. Vet. J.* 9: 51-56.
- Eshhar, Z. (1985). Monoclonal antibody strategy and technique. In T.A. Springer (ed), *Hybridoma Technology in Bioscience and Medicine*. New York: Plenum Press.

- Fauce, Kathy A. La.; Elliman, Jennifer.; & Owens, Leigh. (2007). Molecular characterisation of Hepatopancreatic parvovirus (*PmergDNV*) from Australian *Penaeus merguensis*. *Virology*. 362: 397-403.
- Flegel, T. W.; et al. (1992). Occurrence, diagnosis and treatment of shrimp disease in Thailand. In: Fulks W, Main KL (eds) Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and the United States. *Oceanic Institute, Honolulu* : 57–112.
- Flegel, T. W.; Fegan, D. F.; & Sriurairatana, S. (1995). Environmental control of infectious shrimp diseases in Thailand. In: Shariff, M., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R. (Eds.), *Diseases in Asian Aquaculture, vol. II. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila*. : 65–79.
- Flegel, T. W.; et al. (1999). Statistical correlation between severity of Hepatopancreatic parvovirus (HPV) infection and stunting of farmed black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*. 174: 197–206.
- Flegel, T. W.; et al. (2001). Effects of Hepatopancreatic parvovirus (HPV) Monodon baculovirus (MBV) and multiple viral infections on cultivated shrimp in Thailand. *In The 3rd National Symposium on Marine Shrimp*. : 48-63.
- Flegel, T. W.; et al. (2004). Presence of multiple viruses in non-diseased, cultivated shrimp at harvest. *Aquaculture*. 240: 55–68.
- Flegel, T. W. (2006). Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture*. 258: 1-33.
- Hang, Bui. Thi. Bich. (2007). *Devopment of a monoclonal antibody assay for infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) of shrimp*. M.Sc. (Biotechnology). Bangkok: Mahidol university. Photocopied.
- Köhler, G.; & Milstein, C. (1976). Derivation of specific antibody producing tissue culture and tumor cell fusion. *European Journal of Immunology*. 6: 511-519.
- Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*. 44: 283–292.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lightner, D. V.; & Redman, R. M. (1985). A parvo-like virus disease of penaeid shrimp. *Journal of Invertebrate Pathology*. 45: 47–53.

- Lightner, D. V.; et al. (1993). Development and application of a simple and rapid diagnostic method to study Hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp. *Aquaculture*. 116: 15–23.
- Lightner, D. V.; et al. (1994). Distinction of HPV-type viruses in *Penaeus chinensis* and *Macrobrachium rosenbergii* using a DNA probe. *Asian Fisheries Sciences*. 7: 267-272.
- Lightner, D. V. (1996). A handbook of pathology and diagnostic procedures for disease of penaeid shrimp. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge.
- Lightner, D. V.; & Redman, R. M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*. 164: 201–220.
- Loh, P. C.; et al. (1997). Viral pathogens of the penaeid shrimp. *Advances in Virus Research*. 48: 263–312.
- Manjanaik, B.; et al. (2005). Detection of Hepatopancreatic parvovirus (HPV) in wild shrimp from India by nested polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms*. 63: 255-259.
- Mari, J.; et al. (1995). Partial cloning of the Genome of an unusual shrimp parvovirus (HPV): use of gene probes in disease diagnosis. *Diseases of Aquatic Organisms*. 22: 129–134.
- Mosmann, T. R.; Bauman, R.; & Williamson, A. R. (1979). Mutations affecting immunoglobulin light chain secretion by myeloma cells I. Functional analysis by cell fusion. *European Journal of Immunology*. 9 : 511-516.
- Pantoja, C. R.; & Lightner, D. V. (2000). A non-destructive method based on the polymerase chain reaction for detection of Hepatopancreatic parvovirus (HPV) of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 39: 177–182.
- Paynter, J. L.; Lightner, D. V.; & Lester, R. J. G. (1985). Prawn virus from juvenile *Penaeus esculentus*. In: Australian National Prawn Seminar. pp. 61-64.
- Phromjai, J.; et al. (2001). Different reactions obtained using the same DNA detection reagents for Thai and Korean Hepatopancreatic parvovirus of penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 46: 153–158.
- Phromjai, J.; et al. (2002). Detection of Hepatopancreatic parvovirus in Thai shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization, dot blot hybridization and PCR amplification. *Diseases of Aquatic Organisms*. 51: 227-232.

- Roekring, S.; et al. (2002). Comparison of penaeid shrimp and insect parvoviruses suggests that viral transfers may occur between two distantly related arthropod groups. *Virus Research*. 87: 79–87.
- Rudrappa, K. Umesha.; et al. (2003). Detection by PCR of Hepatopancreatic parvovirus (HPV) and other viruses in hatchery-reared *Penaeus monodon* postlarvae. *Diseases of Aquatic Organisms*. 57: 141-146.
- Rukpratanporn, S.; et al. (2005). Generation of Monoclonal antibodies specific to Hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 65: 85–89.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; & Maniatis, T. (2000). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Third Edition). New York.
- Sithigorngul, P.; et al. (2002). Monoclonal antibodies specific to Yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 49 : 71-76.
- Sukhumsirichart, W.; et al. (1999). Characterization and PCR detection of Hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms*. 38: 1–10.
- Sukhumsirichart, W.; et al. (2002). Detection of Hepatopancreatic parvovirus (HPV) infection in *Penaeus monodon* using PCR-ELISA. *Molecular and Cellular Probes*. 16: 409–413.
- Sukhumsirichart, W.; et al. (2006). Complete nucleotide sequence and Genomic organization of Hepatopancreatic parvovirus (HPV) of *Penaeus monodon*. *Virology*. 346: 266–277.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. LB broth

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast-extract	2.5	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	500.0	มิลลิลิตร

2. LB agar

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast-extract	2.5	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Agar	7.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	500.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข
บัฟเฟอร์และสารเคมี

1. 10X TBE buffer		
Tris-HCl (ปรับ pH 8.3)	108.0	กรัม
Boric acid	55.0	กรัม
EDTA	9.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1000.0	มิลลิลิตร
2. 100mM IPTG		
IPTG	238.0	มิลลิกรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	10.0	มิลลิลิตร
3. Buffer B (100mM NaH ₂ PO ₄ 10mM Tris-HCl 8M Urea pH 6.3)		
NaH ₂ PO ₄	1.38	กรัม
Tris-HCl (ปรับ pH 6.3)	0.12	กรัม
Urea	48.05	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.00	มิลลิลิตร
4. 100mM PMSF		
PMSF	17.4	มิลลิกรัม
Isopropanol (conc.)	1.0	มิลลิลิตร
5. 0.15M Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2		
NaCl	8.00	กรัม
KCl	0.20	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.20	กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.15	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1000.00	มิลลิลิตร
6. 5% Blotto		
นมพร่องมันเนย (Skimmed milk)	5.0	กรัม
PBS	100.0	มิลลิลิตร
1% Merthiolate (Sigma)	1.0	มิลลิลิตร
Triton X-100 (Sigma)	0.1	มิลลิลิตร
7. 1% Merthiolate		
Thimerosal (Sigma)	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

8. 1M KCl		
KCl	7.46	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1000.00	มิลลิลิตร
9. 1% SDS		
SDS	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค
สารเคมีสำหรับการผลิตเซลล์ไฮบริโดมา

1. RPMI medium

RPMI 1640 (Gibco BRL, USA)	10.4000	กรัม
D-glucose (Sigma)	3.6000	กรัม
L-glutamine (Sigma)	0.2923	กรัม
C ₃ H ₃ O ₃ Na (Sigma)	1.1005	กรัม
NaHCO ₃	2.0160	กรัม
HEPES	5.9525	กรัม
Penicillin G)	20,000	units
Streptomycin	200	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น (Milli Q water)	1000	มิลลิลิตร
กรองด้วย sterilized millipore membrane 0.22 ไมโครเมตร		

2. 20% Fetal bovine serum

RPMI medium	80.0	มิลลิลิตร
Fetal calf serum (FCS, Starrate, Australia)		
หรือ Bovine calf serum (BCS, Starrate, Australia)	20.0	มิลลิลิตร
100X HT supplement (Gibco BRL, USA)	1.0	มิลลิลิตร

3. HAT medium

เมื่อดัดแปลงจากหนูเมาส์เข้มข้น 1%

ใน RPMI medium	80.0	มิลลิลิตร
FBS	20.0	มิลลิลิตร
100 X HT supplement	1.0	มิลลิลิตร
50 X Aminopterin (Sigma)	2.0	มิลลิลิตร

4. 40% Polyethylene glycol

Polyethylene glycol	2.0	กรัม
RPMI medium	3.0	มิลลิลิตร

5. 12% Dimethylsulfoxide

Dimethylsulfoxide (Sigma)	12.0	มิลลิลิตร
RPMI medium	88.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ง

สารเคมีสำหรับ SDS-PAGE และ Western blotting

1. Stock solution

1.1 Monomer solution (30% T, 2.7% C_{Bis})

Acrylamide	58.4	กรัม
N,N'-methylene-bis-acrylamide	1.6	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	200.0	มิลลิลิตร

1.2 4 X Running gel buffer (1.5 M tris-HCl, pH 8.8)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	36.3	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	200.0	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย 0.1 N NaOH		

1.3 4 X Stacking gel buffer (0.5 M tris-HCl, pH 6.8)

Tris	3.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	50.0	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย 0.1 N NaOH		

1.4 10% SDS

sodium dodecyl sulfate	50.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	500.0	มิลลิลิตร

1.5 แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10 %

แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1.0	มิลลิลิตร

1.6 Running gel overlay

0.15 M Tris-HCl (1.2)	25.0	มิลลิลิตร
10% SDS (1.4)	1.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100.0	มิลลิลิตร

1.7 2 X Treatment buffer

0.5 M Tris-HCl (1.3)	2.5	มิลลิลิตร
10% SDS (1.4)	4.0	มิลลิลิตร
Glycerol	2.0	มิลลิลิตร
2-Mercaptoethanol	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	0.5	มิลลิลิตร

2. การเตรียม separating gel และ stacking gel

2.1 10% separating gel

Monomer solution (1.1)	10.0	มิลลิลิตร
0.15 M Tris-HCl (1.2)	7.5	มิลลิลิตร
10% SDS (1.4)	0.3	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	12.1	มิลลิลิตร
แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต เข้มข้น 10 % (1.5)	150.0	ไมโครลิตร
TEMED	10.0	ไมโครลิตร

2.2 4% Stacking gel

Monomer solution (1.1)	2.7	มิลลิลิตร
0.5 M tris-HCl (1.3)	5.0	มิลลิลิตร
10% SDS (1.4)	0.2	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	12.2	มิลลิลิตร
แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10% (1.5)	100.0	ไมโครลิตร
TEMED	10.0	ไมโครลิตร

3. Running buffer

4X Tank buffer

Tris	12.0	กรัม
Glycine	57.6	กรัม
10% SDS (1.4)	40.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	4000.0	มิลลิลิตร

4. สารละลายย้อมสีโปรตีน และล้างสีย้อมส่วนเกิน

4.1 สารละลายย้อมสีโปรตีน (Coomassie blue)

4.1.1 Stain stock (1% Coomassie blue R-250)

Coomassie blue R-250	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

4.1.2 Stain

Stain stock (4.1.1)	50.0	มิลลิลิตร
Methanol	250.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	50.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร

4.2 สารละลายล้างสีย้อมส่วนเกิน

4.2.1 Destain 1

Methanol	500.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	100.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

4.2.2 Destain 2

Methanol	50.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	70.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

5. Towbin transfer buffer pH 8.8

Tris	3.0	กรัม
Glycine	14.4	กรัม
Methanol	200.0	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	1000.0	มิลลิลิตร

6. โปรตีนมาตรฐาน (Sigma) ประกอบด้วย

β -Galactosidase, <i>Escherichia coli</i>	116.0	กิโลดาลตัน
Phosphorylase b, rabbit muscle	97.0	กิโลดาลตัน
Albumin, bovine serum	66.0	กิโลดาลตัน
Ovalbumin, chicken egg	45.0	กิโลดาลตัน
Carbonic anhydrase, bovine erythrocytes	29.0	กิโลดาลตัน

ภาคผนวก จ
สารเคมีสำหรับใช้ในการตรวจสอบ ISOTYPE และ SUBISOTYPE ของ
โมโนโคลนอลแอนติบอดี

Hybridoma sub-isotyping kit, mouse (Zymed) ประกอบด้วย

- 1) Rabbit anti-Mouse IgG1 (γ 1 chain specific)
- 2) Rabbit anti-Mouse IgG2a (γ 2a chain specific)
- 3) Rabbit anti-Mouse IgG2b (γ 2b chain specific)
- 4) Rabbit anti-Mouse IgG3 (γ 3 chain specific)
- 5) Rabbit anti-Mouse IgA (α chain specific)
- 6) Rabbit anti-Mouse IgM (μ chain specific)
- 7) Rabbit anti-Mouse kappa light chain
- 8) Rabbit anti-Mouse lambda light chain
- 9) Normal Rabbit Serum, (Negative Control)
- 10) Positive Control, Monoclonal Mouse IgG1
(Mouse IgG1 ใน RPMI-1640 ที่เสริมด้วย 10 % FBS)
- 11) Substrate Buffer, Concentration (10X)
(1 M citrate, pH 4.2, containing 0.03 % H_2O_2)
- 12) ABTS Substrate, Concentrated (50X)
(2,2 – azino-di [3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid])
- 13) Blocking Solution, Concentration (50X)
(25% BSA in PBS and 0.05% NaN_3)
- 14) HPR-Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Concentrated (50X)
- 15) Goat anti-Mouse IgGAM, Concentrated (50X)
(0.5 mg/ml in PBS containing 10% glycerol and 0.05% NaN_3)
- 16) 50% Tween 20

ภาคผนวก จ

สารเคมีสำหรับ ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

1. 0.1 M Citrate buffer, pH 4.5

Sodium citrate	29.4	กรัม
1%Merthiolate	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร
ปรับ pH ด้วย 0.1 N HCl		

2. 1 N H₂SO₄

H ₂ SO ₄ (conc.)	27.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข
สารเคมีสำหรับ immunohistochemistry

1. coated slide solution		
Gelatin	1.0	กรัม
CrK(SO ₄) ₂ .12H ₂ O	50.0	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร
2. Davidson's fixative		
95% ethanol	30.0	มิลลิลิตร
100% formalin	20.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	30.0	มิลลิลิตร
4. Calf serum 10% (P ₁ ⁺)		
Calf serum	10.0	มิลลิลิตร
PBS	100.0	มิลลิลิตร
5. สี Enrilich's acid hematoxylin		
Hematoxylin	8.0	กรัม
95% ethanol	400.0	มิลลิลิตร
Aluminium Potassium Sulphate	8.0	กรัม
Glycerine	400.0	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	400.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	400.0	มิลลิลิตร
6. สี 0.2% Eosin Y ใน 95% ethanol		
Eosin Y	0.2	กรัม
95% ethanol	100.0	มิลลิลิตร

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวชุตีมา ศรีสุข
วันเดือนปีเกิด	28 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2527
สถานที่เกิด	กรุงเทพฯ
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	33/503 ซ.โชคชัย 4 ถ.ลาดพร้าว เขตลาดพร้าว กรุงเทพฯ 10230
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2544	มัธยมศึกษาปีที่ 6 จาก โรงเรียนนวมินทราชินูทิศสตรีวิทยา ๒
พ.ศ. 2548	วท.บ. (จุลชีววิทยา) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
พ.ศ. 2550	วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ