บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NS1 ที่แทรกอยู่ในเวคเตอร์ pET101/D-TOPO ทั้งหมดมี 905 คู่เบส ซึ่งแยกเป็นสองส่วนคือ ส่วนของเวคเตอร์ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 1 – 75 และ 751 – 905 ซึ่งพบส่วนประกอบต่างๆ ในเวคเตอร์ดังนี้ *lac* operator, RSB, V5 epitope, Polyhistidine (6xHis) และ stop codon ส่วนที่สองเป็นส่วนของยีน NS1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 675 คู่เบส โดยเริ่มตั้งแต่ตำแหน่งที่ 76 จนถึงตำแหน่งที่ 225 และเมื่อแปลเป็นกรดอะมิโน ได้ทั้งหมด 225 ซึ่งพบส่วนประกอบต่างๆในกรดอะมิโนของ NS1ดังนี้ star codon, nuclear localization signals,nuclear export signals และกลุ่มกรดอะมิโนที่สามารถจับกับบริเวณ PDZ domains ของเซลล์เจ้าบ้าน

การโคลนยีน NS1 เข้าสู่ *E.coli* สายพันธุ์ One Shot® TOP10F' ทำให้ได้ *E.coli* ต้นฉบับ ซึ่งสามารถสกัดเอา recombinant NS1 เข้าสู่ *E.coli* สายพันธุ์ BL21 Star™ (DE3) ได้โดยใช้กลูโคส 1% เป็นสารอาหารและใช้ IPTG ที่มีความเข้มข้น 0.5 M ที่ปริมาตร 10 ml กระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีน NS1 ในชั่วโมงที่ 5 ซึ่ง crude ของ *E.coli* สายพันธุ์ BL21 Star™ (DE3) ที่มีการชักนำให้เซลล์มีการแสดงออกของโปรตีน NS1 เมื่อทำการพิสูจน์โปรตีนด้วยวิธี western blot โปรตีนที่ได้คือ โปรตีน NS1 ที่มีปริมาณโปรตีน 0.15 mg/ml ในสภาวะทดลองในห้องปฏิบัติการ

อภิปรายผล

ตัวอย่างที่นำมาศึกษาเมื่อเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR และนำเข้าสู่เวคเตอร์ pET101/D-TOPO® เมื่อมีการตรวจสอบมีลำดับนิวคลีโอไทด์ 675 คู่เบส เมื่อแปลเป็นกรดอะมิโนได้ 225 อะมิโน ซึ่งมีการขาดหายไปของลำดับกรดอะมิโนจำนวน 5 อะมิโน ในกรดอะมิโนที่ 80 – 85 [10] จากภาพ 17 แสดงให้เห็นว่า ในเวคเตอร์มียีน NS1 แทรกอยู่ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NS1 เมื่อพิจารณาถึง primers เส้น NS1-F-CACC เป็น primer ด้านปลาย 5' มีการออกแบบให้มี CACC ซึ่งเป็นคู่สมของ GTGG ของเวคเตอร์ pET101/D-TOPO® และเส้น NS1-R-678 เป็น primer ด้านปลาย 3' มีการออกแบบไม่ให้มี stop codon เนื่องจากใช้ stop codon ในเวคเตอร์ pET101/D-TOPO® ฉะนั้นเมื่อได้ผลลำดับนิวคลีโอไทด์จึงไม่พบนิวคลีโอไทด์ที่เป็น stop codon ของยีน NS1และส่วนที่อยู่เหนือ CAAA เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของเวคเตอร์ pET101/D TOPO®

เมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ ภาพ 13 พบว่าตรงกับช่วงที่เป็น lac operol (lacO) และ ribosome binding site (RBS) ของเวคเตอร์, หลังจาก CACC พบ ATG หรือ M เมื่อแปลเป็นกรดอะมิโน (ดังภาพ 18)เป็นตำแหน่ง strat codon ของยีน NS1, นิวคลีโอไทด์ที่ 740 – 751 คือ GAG TCA GAA GTT เมื่อแปลเป็นกรดอะมิโน คือ glutamic acid (E), serine (S), glutamic acid (E) และ valine (V) หรือ ESEV ดังภาพ 17 ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่สำคัญที่สามารถจับกับบริเวณ PDZ domains ของเซลล์โฮสต์ ซึ่งเป็นโปรตีนที่จำเพาะของ protein – protein interaction [46] มีผลทำให้หยุดทำงานและยับยั้งกระบวนการ signaling pathway ต่างๆ ภายในเซลล์ ซึ่งเป็นผลให้เชื้อไวรัสไข้หวัดนก สายพันธุ์ H5N1 มีความรุนแรงเพิ่มขึ้น [46] และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NS1 ตั้งแต่ ATG จนถึงGAG TCA GAA GTT มี 675 นิวคลีโอไทด์ แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 225 นอกจากนี้ยังพบส่วนที่เป็นเวคเตอร์คือ พบส่วนของ V5 epitope, ส่วน Polyhistidine (6xHis) ที่นิวคลีโอไทด์ 830 - 847 ซึ่งเป็นส่วนที่ใช้สำหรับตรวจยืนยันโปรตีนที่บริสุทธิ์ด้วยวิธี western blot และในขั้นตอนทำให้โปรตีนบริสุทธิ์จะจับกับ Ni^{2+} และต่อจาก 6xHis นิวคลีโอไทด์ที่ 848 – 850 คือ TGA เป็น stop codon ของเวคเตอร์ นอกจากนี้กรดอะมิโนบางส่วนของโปรตีน NS1 มีการศึกษารายงานว่า เป็นกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่ nuclear localization signals ซึ่งได้แก่กรดอะมิโนตัวที่ 35 ถึง 38 (RLRR) และกรดอะมิโนตัวที่ 211 ถึง 216 (PNQKRK) และกรดอะมิโนอีกกลุ่มที่ทำหน้าที่ nuclear export signals ได้แก่กรดอะมิโนตัวที่ 133 ถึง 142 (FDRLETLILL) ดังภาพ 18 ทำให้โปรตีน NS1 สามารถออกมาจากนิวเคลียสและทำหน้าที่ต่อต้านระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์เจ้าบ้านระหว่างที่เกิดขบวนการ viral life cycle กรดอะมิโน nuclear localization signals และ nuclear export signals เป็นกลุ่มที่ช่วยทำให้โปรตีน NS1 สามารถเข้าออกนิวเคลียสของเซลล์โฮสต์ได้

เมื่อย้อนกลับไปดูในภาพ 14,15 ทำให้ทราบว่า NS1 ในส่วนของ RNA-Binding domain ตั้งแต่ลำดับที่ 1 – 73 ยังคงมี α-helices ที่ประกอบด้วย 3 ส่วนเหมือนเดิมคือ Asn4-Asp24 (helix 1), Pro31-Leu50 (helix 2) และ Ile54-Lys70 (helix 3) ซึ่งใน helix 2 มี arginine ที่ตำแหน่ง 38 (Arg38) และ lysine ที่ตำแหน่ง 41 (Lys41) ทั้งสองตัวนี้มีหน้าสำคัญในการจับกับdsRNA เป้าหมาย ซึ่งมีรูปร่างคล้ายตัวอักษร A จึงเรียก A-form dsRNA ดังภาพ 8 ข [17]

เมื่อตรวจสอบ recombinant plasmid NS1 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนยีน NS1 จึงนำrecombinant plasmid NS1 ที่อยู่ใน *E.coli* สายพันธุ์ One Shot® TOP 10 มาสกัดเอาส่วน recombinant plasmid NS1 ออก เพื่อนำเข้า *E.coli* สายพันธุ์ BL21 Star™ (DE3) โดยใช้วิธี Heat-shock ได้ recombinant plasmid NS1 ใน *E.coli* สายพันธุ์ BL21 Star™ (DE3) เป็นตัวตั้งต้น (starter) สำหรับทำexpression protein ซึ่ง starter ที่ได้ไม่สามารถเก็บ recombinant

plasmid NS1 ไว้ภายในเซลล์ *E.coli* สายพันธุ์ BL21 Star™ (DE3) ไว้ได้นาน เนื่องจาก recombinant NS1 เป็นสิ่งแปลกซึ่งเซลล์ *E.coli* อาจขับออกได้และ *E.coli* สายพันธุ์ BL21 Star™ (DE3) มียีน *endA* และ *recA* ทำให้เลี้ยงได้ยากและโตช้ากว่าสายพันธุ์อื่น จึงไม่เหมาะสำหรับเลี้ยงเซลล์เพื่อเก็บไว้เป็น stock ฉะนั้นถ้าจะเก็บ recombinant plasmid NS1 ควรเก็บที่ *E.coli* สายพันธุ์ One Shot® TOP 10F' ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทำการเปลี่ยนแปลงการเกิด mutation ที่ยีน *mcrA*, mcr*B* และ *mrr* ซึ่งทั้งสามยีนจะสร้างระบบการทำลาย methylated DNA ดังนั้นจึงสามารถทำการโคลนนิ่งจาก *E.coli* นี้ได้โดย methylated DNA ไม่ถูกทำลาย ในด้านการทำให้ยีน NS1 มีการแสดงออกด้วย *E.coli* สายพันธุ์ BL21 Star™ (DE3) ได้มีการมิวเตชันยีน *rne131* ทำให้ mRNA เสถียรไม่ถูกทำลายได้ง่ายด้วยเอมไซม์ RNase ส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนได้มากกว่า *E.coli* สายพันธุ์ BL21 Star™ (DE3) ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการ induce ให้ *E.coli* ผลิตโปรตีน NS1 ได้ใช้ carbenicillin ที่มีความเข้มข้น 100 µg/ml แทน ampicillin เนื่องจาก carbenicillin มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า ampicillin และ ampicillin ทำให้พลาสมิดไม่เสถียร อาจมีผลทำให้เซลล์ขับพลาสมิดที่มียีน NS1 ออกมา และทำให้มีการสังเคราะห์โปรตีนในปริมาณน้อยลง พลาสมิดที่มี antibiotic resistance marker สามารถเจริญได้ในอาหารที่มียาปฏิชีวนะ แต่จะทำลายพลาสมิดที่เป็นเซลล์เปล่า [47] ในการเติมแหล่งคาร์บอนเช่นกลูโคส ในขณะที่มีการชักนำทำให้นำไปสู่การลดอัตรา metabolic [48] ซึ่งทำให้ได้โปรตีนที่ต้องการมากขึ้น

จากภาพ 25 เมื่อได้ pellet ของ *E.coli* สายพันธุ์ BL21 Star™ (DE3) มาทำการเติมสารละลาย lysis buffer ลงไป นำไปต้มและทำการ freeze thaw ได้เป็นส่วนของ pellet กับส่วน supernatant ซึ่งทั้งสองส่วนได้นำมาดูขนาดด้วยวิธี SDS-PAGE ซึ่งภาพที่ได้ พบว่า pellet ไม่มีการแยกเป็นชั้นให้เห็นอย่างชัดเจน อาจเป็นเพราะ pellet ที่นำมาดูขนาดโปรตีนถูก denature ด้วยสารละลายไม่สมบูรณ์ ทำให้รูปร่างบางส่วนยังจับเป็นก้อนอยู่จึงไม่สามารถเดินทางผ่านรูของ gel ที่มีขนาด 12% ได้อย่างสะดวก ฉะนั้นเมื่อนำ pellet มา run SDS-PSGE จึงควรทำให้ pellet ละลายใน lysis buffer ที่มีลักษณะเป็นสารลายจึงนำดูขนาดโปรตีน

จากภาพ 25 โปรตีนที่ได้อยู่ในส่วนของ pellet คือส่วนที่ไม่ละลายน้ำ เมื่อกลับไปพิจารณาภาพ 14 และ 15 ที่ได้จากการนำลำดับนิวลีโอไทด์ ภาพ 19 – 24 มาวิเคราะห์และจัดลำดับเบสด้วยโปรแกรม BIOEDIT (version 7.0.4.1) และเปลี่ยนลำดับเบสให้เป็นกรดอะมิโน ซึ่งแสดงดังภาพ 18 จากนั้นได้นำลำดับกรดอะมิโนของ NS1 มาทำการวิเคราะห์การละลายของโปรตีนโดยนำลำดับกรดอะมิโนเข้าสู่โปรแกรมการหาค่า mean hydrophobicity และค่า Amino Acid Composition ในโปรแกรม BIOEDIT (version 7.0.4.1) ซึ่งพบว่าโปรตีน NS1 มีทั้งส่วนที่

ละลายน้ำ และไม่ละลายน้ำ ถ้าเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ส่วนที่ไม่ละลายน้ำมีมากถึง 49.79 เปอร์เซ็นต์ ,ส่วนที่ละลายน้ำ 30.67 เปอร์เซ็นต์ และส่วนที่เป็น uncharger มี 19.55 เปอร์เซ็นต์ ถ้ามีการแบ่งส่วนที่มีขั้วมี 50.22 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่มีขั้วมี 49.79 เปอร์เซ็นต์และพบส่วนที่ไม่ละลายน้ำอยู่ในช่วงแรกและช่วงกลางประมาณกรดอะมิโนที่ 100 ถึง 160 และช่วง 170 – 185 และโปรตีน NS1 บางส่วนอาจมีลักษณะเหมือน peripheral membrance protein คือเป็นโปรตีนที่สามารถจับกับชั้นไขมัน (lipid bilayer) หรือ integral protein ของผนังเซลล์แบคทีเรีย [38] ซึ่งส่วนนี้ละลายน้ำได้ยาก ซึ่งภาพ 14, 15 ดูในภาพรวมโปรตีน NS1 มีส่วนที่เป็น hydrophobic เกือบครึ่งหนึ่งของโปรตีนที่สามารถจับกับ lipid bilayer ของ *E.coli* ได้ และจากภาพ 14, 15 ทำให้ทราบว่าโดยธรรมชาติโปรตีน NS1 เป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ แม้ว่าส่วน C – terminal ของโปรตีน NS1 เป็น hydrophilic ซึ่งส่วนที่เป็น hydrophobicity ของโปรตีน NS1 อาจทำให้โปรตีน insoluble อยู่ใน inclusion body [8,27] ซึ่งโปรตีนใน inclusion body ที่ได้โดยทั่วไปจะเป็นโปรตีนประเภท hydrophobic [8]

การแสดงออกของโปรตีน NS1 ซึ่งได้มีงานวิจัยที่มีการแสดงออกของโปรตีน NS1 พบว่าในชั่วโมงที่ 5 เป็นชั่วโมงที่เหมาะที่สุด [26] เช่นกัน และจากภาพ 25 แสดงให้เห็นว่าการผลิตโปรตีนในชั่วโมงที่ 4 และ 6 ได้โปรตีนมากแต่มีส่วนที่เป็นโปรตีนของเซลล์เข้มมาก ซึ่งโปรตีนส่วนนี้จะต้องกำจัดออก ถ้ามีมากจะทำให้กำจัดยากและถ้าเป็นในระดับอุตสาหกรรมที่มีการเลี้ยงเซลล์ในปริมาณมาก ทำให้การกำจัดยากยิ่งขึ้น

ในระดับอุตสาหกรรม การเลี้ยงเซลล์ recombinant ในสภาวะที่ให้ได้ผลผลิตสูง จะเป็นสภาวะที่เหมาะสำหรับเซลล์ที่ไม่สร้าง recombinant โปรตีนมากกว่า เนื่องจากเซลล์เหล่านี้สามารถใช้พลังงานเพื่อการเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่ หากมีเซลล์เหล่านี้ปนอยู่จะสามารถเพิ่มจำนวนได้มากกว่า recombinant โปรตีนที่ต้องการ ทำให้ได้โปรตีนที่ต้องการลดลง และเซลล์ที่ไม่สร้าง recombinant โปรตีน มักเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้เอง เป็นผลทำให้เกิดการลบยีนหรือจัดยีนใหม่ [49] ดังนั้นในช่วงแรกของการผลิต recombinant protein NS1 ควรใช้สภาวะที่ไม่ให้มีการแสดงออกของ recombinant protein NS1 จนกระทั่งมีการเจริญเต็มที่จึงเปลี่ยนสภาวะการเลี้ยงเซลล์ให้สร้าง recombinant protein NS1 การควบคุมสภาวะนี้จึงต้องใช้เวคเตอร์ที่มี IPTG ในการกระตุ้นให้*E.coli* สายพันธุ์ BL21 Star™ (DE3) เกิดการแสดงออกของโปรตีน NS1 แต่ถ้าผลิตอย่างจริงจังการใช้ *E.coli* 2 ตัว อาจทำให้เกิดปัญหายุ่งยากในการผลิตหรืออาจเกิดการปนเปื้อนและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย

ในขั้นตอนที่ทำให้มีการแสดงออกของโปรตีนนั้น ถ้าเทียบกับการผลิตระดับอุตสาหกรรม ขั้นตอนนี้เรียกว่า กระบวนการหมัก โดยจะนำเอาเซลล์ *E.coli* เลี้ยงในถังหมัก (fermenter) ขนาด

ตั้งแต่ 10 – 500,000 ลิตร การเลี้ยงในถังหมักขนาดใหญ่เรียกว่า Industrial fermentation ซึ่งในเซลล์ *E.coli* เลี้ยงแบบต้องการอากาศ (aerobic) เนื่องจากทำให้เซลล์มีการเจริญเร็ว ใช้เวลาหมักน้อยและได้ผลผลิตสูง ในการเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการขนาดที่เลี้ยงน้อยกว่า 1 ลิตร ซึ่งในที่นี้เลี้ยง 10 ml สามารถเลี้ยงในขวดแก้วทรงสูง หรือ Flak และเขย่า โดยที่บรรจุน้ำเลี้ยงไม่เกิน 10 – 20% ของปริมาตร ซึ่งมักไม่มีปัญหาในการให้ออกซิเจน แต่ในระดับอุตสาหกรรมต้องมีการระมัดระวังในเรื่องของการละลายของออกซิเจน ในน้ำเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากขณะที่เซลล์ *E.coli* เจริญรวดเร็วจะต้องการออกซิเจนสูง โดยสามารถเติมอากาศให้ออกซิเจนละลายในน้ำเลี้ยงเพื่อเข้าไปทำปฏิกิริยากับระบบขนถ่านอิเลคตรอนที่ผิวเซลล์ ซึ่งอาจใช้ใบพัดช่วยกวนน้ำเลี้ยงเซลล์ ขณะเดียวกันต้องให้ปริมาณออกซิเจนเหมาะสมกับอุณหภูมิ ซึ่งการละลายของออกซิเจนจะลดลงตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น ถ้าอุณหภูมิที่เหมาะสมกับ *E.coli* ที่ใช้เป็น 35°C จะมีค่าการละลายของออกซิเจนที่ 1 บรรยากาศ ประมาณ 6.99 ml/l ดังนั้นการเพิ่มการละลายออกซิเจนอาจต้องเพิ่มความแก๊สช่วยในการละลายและอุณหภูมิ สามารถใช้ระบบตรวจวัดอุณหภูมิที่ต่อเข้ากับระบบควบคุมการไหลเวียนของท่อน้ำหล่อเย็นในถังหมัก ในกรณีที่อุณหภูมิสูงเกินกำหนดระบบจะให้มีการไหลเวียนของน้ำ และนอกจากนี้ต้องมีการควบคุม pH เนื่องจากกระบวนการเมตาโบลิซึมของ *E.coli* มักทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง pH ของน้ำหมักพร้อมกับการเปลี่ยนลักษณะทางกายภาพของ *E.coli* ซึ่งในระบบจะมีหัววัด pH ของน้ำหมักที่ต่อกับระบบควบคุมการเติมกรดหรือด่าง [47,48]

โปรตีน NS1 อยู่ในรูปของ pellet ที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ เมื่อนำเอาส่วนนี้มาละลายใน buffer B ที่มี pH 8 ของชุดทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ Ni-NTA Spin kit (Qiagen) บ่มทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง พร้อมเขย่า ได้ lysate supernatant โดยไม่ต้องใช้วิธี sonicate, freeze and thaw ซึ่งพบว่า pellet มีลักษณะใสขึ้น แสดงว่า pellet สามารถละลายได้เป็นสารละลาย ทำให้ง่ายต่อการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ เมื่อนำสารละลายมาหาขนาดโปรตีนด้วย SDS-PAGE ได้ ดังภาพ 26 ที่พบแถบโปรตีนอยู่ที่ตำแหน่ง 26 kDa ซึ่งอยู่ในส่วนของ supernatant ในระดับอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักนำมาแยกและทำให้มีความบริสุทธิ์ กระบวนการการแยก เรียกว่า กระบวนการหลังการหมัก (Downstream processing) หรือกระบวนการแยกทางชีวภาพ (Bioseparation) [50] ซึ่งผลิตภัณฑ์จากน้ำหมักคือ โปรตีน NS1 เป็นองค์ประกอบที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular) คือสร้างขึ้นภายในเซลล์และไม่ถูกขับออกมานอกเซลล์ จะต้องทำให้เซลล์แตกก่อนซึ่งเป็นกระบวนการทำให้เซลล์แตก จากนั้นมีการแยกกากเซลล์ออกจากของเหลวที่มีผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ จากนั้นจึงนำส่วนของเหลวที่ได้ไปทำการแยกผลิตภัณฑ์ ซึ่งเรียกว่า กระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์และทำให้ผลิตภัณฑ์มีความบริสุทธิ์ ซึ่งคือกระบวนการทำให้ผลิตภัณฑ์มีความบริสุทธิ์ [50]

เมื่อโปรตีนสามารถละลายได้ จึงทำให้โปรตีน NS1 บริสุทธิ์ ตามวิธีของ Ni-NTA Spin kit (Qiagen) จากนั้นจึงนำส่วนที่เก็บมาดูขนาดโปรตีนด้วย SDS-PAGE ดังภาพ 28 พบว่ามีแถบโปรตีน NS1 ที่ตำแหน่ง 26 kDa และจากภาพสังเกตได้ว่า ในช่องที่ 4 เป็นขั้นตอนการล้างตามหลักการไม่ควรพบแถบโปรตีน แต่อาจเป็นเพราะ lysate supernatant มีความเข้มข้นมากเกินกว่าที่นิเกิลในคอลัมน์ของชุดทดสอบจะรับได้จึงทำให้โปรตีนหลุดออกมาได้ หรือ low affinity ทำให้ประสิทธิภาพในการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ลดลงเนื่องจาก histidine tag ไม่สามารถจับกับนิเกิลในคอลัมน์ได้อย่างสมบูรณ์ [47] แต่ก็มีส่วนหนึ่งที่สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ในช่องที่ 5, 6 แต่มีข้อเสียของวิธีนี้ที่ไม่สามารถทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป โปรตีน NS1 ที่ได้นำมาวัดปริมาณโปรตีน ในการทำ standard ได้ใช้ BSA ที่มีความเข้มข้นเป็น g/l เนื่องจากสามารถชั่งสารได้ง่ายทำให้เกิดความผิดพลาดของการเตรียม standard น้อย จากนั้นจึงปรับความเข้มข้นเป็น mg/ml ในการวัดหาปริมาณโปรตีนได้นำ supernatant ที่ได้จากภาพ 28 คือ lysis, flow-through, wash และ elute ซึ่งจากความเข้มข้นที่วัดปริมาณโปรตีนสอดคล้องตามภาพ 28 และโปรตีน NS1 ที่ได้มีปริมาณ 0.15 mg/ml ซึ่งมีปริมาณน้อย ดังนั้นควรมีศึกษาการขยายปริมาณการเลี้ยงเพื่อจะทำให้ได้โปรตีนจำนวนเพิ่มขึ้น และก่อนนำมาใช้ควรทำ dialysis ก่อนเพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ต่างๆออก ซึ่งอาจนำโปรตีน NS1 ที่ได้มาทดสอบกับซีรั่มของสัตว์ปีกด้วยวิธี dot blot ซึ่งเป็นการทดสอบหาแอนติบอดีของสัตว์ปีกในเบื้องต้นก่อนที่จะนำมีการเพิ่มผลผลิตของโปรตีน NS1

จากภาพ 27 แสดงให้เห็นว่า *E.coli* สายพันธุ์ BL21 Star™ (DE3) มีโปรตีนที่อยู่ในช่วงเดียวกับโปรตีน NS1 จึงทำการพิสูจน์ crude โปรตีนของโปรตีนของ *E.coli* สายพันธุ์ One Shot® BL21 star (DE3), crude โปรตีนของ *E.coli* สายพันธุ์ One Shot® BL21 star (DE3) ที่ไม่มีการชักนำให้เซลล์มีการแสดงออกของโปรตีน NS1 และสุดท้ายเป็น crude โปรตีนของ *E.coli* สายพันธุ์ One Shot® BL21 star (DE3) ที่มีการชักนำให้เซลล์มีการแสดงออกของโปรตีน NS1 มาทำ Western Blot ดังภาพ 27 ซึ่งแสดงว่าของเหลวที่ต้องการที่ได้จาก crude โปรตีนที่มีการชักนำให้ผลิตโปรตีน คือ ของเหลวที่เป็นโปรตีน NS1 โปรตีนที่ได้ในการทำให้บริสุทธิ์นำมายืนยันด้วยวิธี Western Blot เพื่อดูว่าโปรตีน คือโปรตีน NS1 ซึ่งเมื่อผลิตโปรตีน NS1 ออกมา โปรตีนมีส่วน C – terminal ที่มี 6X-histidine tag ซึ่งสามารถจับกับ Anti-HisG-HRP Antibody ได้และตัวนี้เป็น primary antibody ซึ่งจะมี secondary antibody หรือ Anti-IgG mouse anti-His Ab conjugate HRP มาจับ จากนั้นเติม TMB substrate เพื่อย่อย HRP แล้วเกิดสีฟ้าอมเขียว

ฉะนั้นเมื่อนำ crude โปรตีนของ *E.coli* สายพันธุ์ One Shot® BL21 star (DE3) ที่มีการชักนำให้เซลล์มีการแสดงออกของโปรตีน NS1 มาทำให้บริสุทธิ์จนสิ้นกระบวนการ ได้ของเหลวที่เป็นโปรตีน NS1 ที่บริสุทธิ์ ดังภาพ 28 ซึ่ง crude ที่ได้เลี้ยงเซลล์ปริมาตรเพียง 10 ml จากนั้นมีการศึกษาว่า lysate supernatant ที่ได้สามารถเก็บไว้ในระยะเวลาเท่าใด ซึ่งพบว่า lysate supernatant ที่เก็บไว้เพียง 1 คืน ดังภาพ 31 เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์ โปรตีนที่ได้ในช่วง elute ที่ยังไม่ได้พิสูจน์ด้วยวิธี Western Blot พบว่า มีแถบโปรตีนของ *E.coli* สายพันธุ์ BL21 Star™ (DE3) เกิดขึ้นหลายแถบ ซึ่งทำให้ไม่สามารถทำให้โปรตีน NS1 บริสุทธิ์ได้ จึงทำการพิสูจน์โปรตีนที่พบที่ตำแหน่ง 26 kDa ด้วยวิธี Western Blot ทำให้เห็นว่า โปรตีนที่ตำแหน่ง 26 kDa คือ โปรตีน NS1 จากนั้นเก็บ lysate supernatant อีก 1 คืน ทำให้พบว่าโปรตีนที่ได้ในช่วง elute ที่ยังไม่ได้พิสูจน์ด้วยวิธี Western Blot พบว่า มีแถบโปรตีนของ *E.coli* สายพันธุ์ BL21 Star™ (DE3) เกิดขึ้นหลายแถบ ซึ่งทำให้ไม่สามารถทำให้โปรตีน NS1 บริสุทธิ์ได้เช่นกัน แต่เมื่อพิสูจน์ด้วยวิธี Western Blot พบว่า crude โปรตีน NS1 และ โปรตีน NS1 ที่ทำให้บริสุทธิ์ เกิดแถบสีขึ้น 3 แถบ ที่ตำแหน่งเดียวกัน ดังภาพ 31 ซึ่งอาจเป็นเพราะเกิดจากการที่เซลล์ผลิตโปรตีนที่ต้องการออกมามากจำนวนใด โปรตีนต่างๆในเซลล์จะถูกสร้างออกมาด้วย มีผลทำให้โปรตีนที่ต้องการถูกทำลายได้ในขณะที่อยู่ในเซลล์และขณะที่การสังเคราะห์โปรตีนยังไม่สิ้นสุด ถึงแม้จะสามารถควบคุมสภาวะเลี้ยงเซลล์ให้มีโปรติเอสต่ำ แต่ก็ไม่สามารถลดปัญหาดังกล่าวให้หมดไปได้ [49] และเมื่อพิจารณาถึงครั้งแรกที่นำโคลนที่มียีน NS1 มากระตุ้นให้มีการแสดงออกของโปรตีน NS1 ใน *E.coli* ซึ่งมีการผลิตโปรตีนออกมาเป็นจำนวนมากและมีโปรตีนหลายชนิด ซึ่งโปรตีนเหล่านี้อาจมีโปรตีนที่เป็นโปรติเอสอยู่ด้วย จึงมีการตัดส่วนใดส่วนหนึ่งหรือส่วน N - terminal ของโปรตีน NS1 ออกเป็น 3 ส่วน จึงทำให้ histidine tag ที่มีอยู่ที่ C – terminal สามารถจับกับ Anti-His C-HRP Antibody ได้เห็นเป็น 3 แถบ และโดยทั่วไปโปรติเอสในเซลล์จะทำหน้าที่ตัดโปรตีนที่มีส่วน non-polar มากในช่วง C - terminal และโดยทั่วไปโปรตีนที่มีการผลิตออกมาเป็นจำนวนมากของ recombinant proteinสามารถถูกทำลายได้ในชั้น periplasm [47] และในกรณีที่ โปรตีน NS1 มีส่วนที่เป็น nuclear export signals ได้แก่กรดอะมิโนตัวที่ 133 ถึง 142 (FDRLETLILL) [16] ดังภาพ 18 ส่วนนี้ทำหน้าที่ขับโปรตีน NS1 ให้อยู่ที่ส่วน periplasmic space ซึ่งเป็นช่องว่างระหว่าง periplasmic membrane กับเซลล์เมมเบรม และช่องว่างดังกล่าวประกอบด้วยโปรติเอสจำนวนมาก มีผลให้โปรติเอสอาจทำลายโปรตีน NS1 [49,50] และโดยปกติโปรตีนที่มี signal sequence ถ้าทำให้มีการแสดงออกใน *E.coli* อาจไม่มีผลทำให้โปรตีนที่สังเคราะห์ออกมาได้ขับออกสู่นอกเซลล์ แต่มักขับออกให้อยู่ในส่วน periplasmic space และโปรตีนที่อยู่ที่บริเวณนี้จะต้องถูกตัด amino – terminal signal sequence

ออกก่อนจึงจะเข้าสู่ periplasm ได้ และโปรตีนที่มีลักษณะที่ผิดปกติ (misfold) จะเกิดจากสาเหตุต่างๆ เช่นอาจเกิดจาก mutation จึงส่งผลให้เกิดการผิดปกติของโปรตีน, ความกดดันทางสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ และสุดท้ายที่ทำให้โปรตีนผิดปกติเป็นการ overexpression ของยีน recombinant ซึ่งโปรตีนที่ผิดปกติเหล่านี้อาจถูกทำลายโดยโปรติเอสหรือถูกซ่อมแซมโดย chaperones ซึ่งถ้าจะให้โปรตีนขับออกมานอกเซลล์ควรใช้ยูคาริโอตแทน [47] หรืออาจเป็นในขั้นตอนที่ทำให้เซลล์แตก ทำให้มี protease FtsH ที่อยู่ใน inner membrane ออกมาซึ่งโปรติเอสตัวนี้ทำงานได้ดีภายใต้สภาวะที่เป็น denaturing ในครั้งแรกอาจยังพบ แต่เมื่อทิ้งโปรตีนไว้ 1 - 2 วัน โปรติเอสทำงานได้ดีขึ้น อาจตัดโปรตีน NS1 ส่วน N - terminal ออกเหลือส่วนที่เป็น C - terminal ที่มี 6His-taq อยู่ เมื่อนำมาดูขนาดด้วยวิธี SDS-PAGE และยืนยันด้วย Western blot จึงพบโปรตีนมี 3 ขนาด ดังนั้นโปรตีน NS1 ที่จะนำไปใช้ในงานอื่นควรที่จะมีการ expression ใหม่เสมอ เช่นเดียวกับ lysate supernatant ไม่ควรเก็บไว้เป็นเวลานาน ควรทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ทันทีเพื่อที่จะได้ไม่เกิดปัญหาการปนเปื้อนของโปรตีนจากเซลล์ โดยปกติเชื้อไวรัสไข้หวัดนกเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านมีการสังเคราะห์โปรตีนในไรโบโซมจากนั้นโปรตีนเดินทางไปที่ ER membrance โดยอาศัยโพลีเปปไทด์สายสั้นๆ หรือที่เรียกว่า signal sequence โปรตีนกลุ่มนี้มีกรดอะมิโนที่เป็น hydrophobic ในส่วนนี้สามารถจับกับ RNP complex ซึ่งเรียกว่า signal recognition particle (SRP) ทำให้บริเวณนี้เข้าไปจับกับ receptor บน ER ได้ แต่ในกรณีที่มีการศึกษานี้เป็นการผลิตโปรตีน NS1 จากเชื้อ *E.coli* ซึ่งเป็น Prokaryotic ที่มีเพียงไรโบโซมที่ใช้สำหรับผลิตโปรตีนเท่านั้น ซึ่งอาจทำให้โปรตีน NS1 ที่ผลิตโปรตีนออกมานี้อาจมีลักษณะของการพับของโปรตีนที่ต่างจากโปรตีนในธรรมชาติ

Ni-NTA Spin kit ที่นำมาใช้ในงานวิจัยเป็น hydrophobic interaction chromatography (HIC) ซึ่งมีการใช้เกลือที่มีความเข้มข้นสูงและเกลือนี้อาจไปจับกับ column ฉะนั้นเมื่อมีการ elute เกลือที่มีความเข้มข้นสูงอาจหลุดออกมาพร้อมกับโปรตีน NS1 ถ้าปริมาณโปรตีนมีน้อย เกลือที่มีความเข้มข้นสูงหลุดออกมาเป็นจำนวนมากจะทำให้นำเอาโปรตีนอื่นออกมา จึงทำให้โปรตีน NS1 ในขั้นตอน elute มีโปรตีน 2 ขนาด ดังภาพ 28 ดังนั้นก่อนที่จะนำโปรตีน NS1 มาใช้ควรนำเอาเกลือออกหรือเรียกว่า desalt ด้วยวิธีอื่น เช่น Ion exchange (IEX) และ Gel filtration (GF) ซึ่งจะทำให้ได้โปรตีน NS1 ที่บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น

ข้อเสนอแนะ

โปรตีน NS1 ที่ทำให้บริสุทธิ์ ควรนำไปประยุกต์ใช้กับวิธี Dot Blot ซึ่งสามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคไข้หวัดนกในระดับห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับการตรวจหาแอนติบอดีต่อโปรตีน NS1 ในซีรั่มสัตว์ปีกที่สงสัยจะเป็นโรคไข้หวัดนก และการใช้ *E.coli* สายพันธุ์ One Shot® BL21 star

(DE3) ในการผลิตโปรตีนสามารถทำได้ง่ายเนื่องจากเจริญเติบโตเร็วและสามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณมาก น่าจะมีโอกาสที่จะผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ง่าย และควรพัฒนาวิธีการทำให้โปรตีน NS1 บริสุทธิ์ในปริมาณที่มากขึ้น ที่สามารถจะนำไปใช้ในการผลิตชุดทดสอบอื่น เป็นการรองรับการใช้วัคซีน DIVA ที่อาจมีขึ้นในอนาคต