รายการอ้างอิง

[1] World Health Organization. 2000. Strengthening the implementation of the global strategy for dengue fever/dengue hemorrhagic fever prevention and control. WHO, Geneva

[2] สำนักงานระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. 2548. สรุปรายงานการเฝ้าระวังโรค. หน้า28-35.

[3] วัชรี โชคจินดาชัย. การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกีโดยการตรวจน้ำเหลืองด้วยวิธีรวดเร็ว. หน้า 147-162.

[4] พรเทพ สวนดอก และวันล่า กุลวิชิต. การตรวจวินิจฉัยการติดเชื้อไวรัสเดงกีโดยวิธีทางชีวโมเลกุล. หน้า 163-170.

[5] Maria G.; Kouri, G, G; 2004. Dengue diagnosis, advances and challenges. International of Infectious Disease, 8: 69-80

[6] Teles FR.; Prazeres DM; Lima-Filho JL. 2005. Trends in dengue diagnosis. Rev Med Virol, 15: 287-302

[7] Skladal, P. 2003. Piezoelectric quartz crystal sensors applied for bioanalytical assays and characterization of affinity interactions. J. Braz. Chem. Soc. 14:491-500.

[8] Michalzik, M.; Wilke, R.; and Buttgenbach, S. 2005. Miniaturized QCM-based flow system for immunosensor application in liquid. Sensors and Actuators 111-112: 410-415

[9] Pastorino, L.; Soumet, C. F.; Giacomini, M.; and Ruggiero, C. 2006. Development of a piezoelectric immunosensor for the measurement of paclitaxel. Journal of Immunological Methods. 313: 191-198.

[10] Yokoyama, K.; Ikebukuro, K.; Tamiya, E.; Karube, I.; Ichiki, N.; and Arikawa, Y. 1995. Highly sensitive quartz crystal immunosensors for multisample detection of herbicides. Analytica Chimica Acta. 304: 139-145.

[11] Towery, R. B.; Fawcett, N. C.; and Evans, J. A. 2004. Determination of chloroplast DNA in a cultured soybean line using a QCM biosensor. IEEE Sensors Journal. 4: 489-493.

[12] Tai, D. F.; Lin, C. Y.; Wu, T. Z.; and Chen, L. K. 2005. Recognition of dengue virus protein using epitope-mediated molecularly imprinted film. Anal. Chem. 77: 5140-5143.

[13] Tai, D. F.; Lin, C. Y.; Wu, T. Z.; Huang, J. H.; and Shu, P. Y. 2006. Artificial receptors in serologic tests for the early diagnosis of dengue virus infection. Clinical Chemistry. 52: 1486-1491.

[14] Su, C. C.; Wu, T. Z.; Chen, L. K.; Yang, H. H.; and Tai, D. F. 2003. Development of immunochips for the detection of dengue viral antigens. Analytica Chimica Acta. 479: 117-123.

[15] Wu, T. Z.; Su, C. C.; Chen, L. K.; Yang, H. H.; Tai, D. F.; and Peng, K. C. 2005. Piezoelectric immunochip for the detection of dengue fever in viremia phase. Biosensors and Bioelectronics. 21: 689-695.

[16] Atashbar, M. Z.; Bejcek, B.; Vijh, A.; and Singamaneni, S. 2005. QCM biosensor with ultra thin polymer film. Sensors and Actuators. 107: 945-951.

[17] Sakti, S. P.; Rosler, S.; Lucklum, R.; Hauptmann, P.; Buhling, F.; and Ansorge, S. 1999. Thick polystyrene-coated quartz crystal microbalance as a basis of a cost effective immunosensor. Sensors and Actuators. 76: 98-102.

[18] Quian, W.; Yao, D.; Yu, F.; Xu, B.; Zhou, R.; Bao, X.; and Lu, Z. 2000. Immobilization of antibodies on ultrafat polystyrene surfaces. Clinical Chemistry. 46: 1456-1463.

[19] http://www.aurelienr.com/electronique/piezo/piezo.pdf

[20] Bradshaw, L. 2000. Understanding piezoelectric quartz crystals. RF design. August: 56

[21] Pazen, B.; Arthur B. 1983. Design of crystal and other harmonic. John Wiley&Sons.

[22] http://www.biology.arizona.edu/IMMUNOLOGY/tutorials/antibody/structure.html

[23] http://www.chemicon.com/resource/ANT101/a1.asp

[24] มานะ ศรียุทธศักดิ์. 1992. ตัวตรวจรู้ชีวภาพ:ไบโอเซนเซอร์.

[25] อธิป นิลแก้ว. 2546. ภูมิคุ้มกันวิทยา. ครั้งที่ 1.

[26] Clausen, J. 1974. Immunochemical Techniques for the Identification and Estimation of Macromolecules. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Vol.1 Part 3. Netherlands: North-Holland Publishing Company – Amsterdam.

[27] http://www.ams.cmu.ac.th/depts/clinimm/311-chapter7.pdf

[28] World Health Organization. 2002. Dengue and dengue haemorrhagic fever. Fact sheet N°117. WHO Media centre.

[29] Jenning, B. G. 1993. Dengue Vaccines. Phil J Microbiol Infect Dis. 22(1): 28-30.

[30] Sauerbrey. G. Z. 1959. Phys. **155**: 206

ภาคผนวก

การพัฒนาวิธีการผลิตโปรตีนคอมบิแนนต์ของเด็งกี่ไวรัสเพื่อใช้ในชุดตรวจวินิจฉัยโรคไข้เลือดออก

นางสาว ชัญญา พุทธิขันธ์

บทคัดย่อ

ในการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยโรคไข้เลือดออกอย่างรวดเร็ว จำเป็นต้องมีแอนติเจนที่ดีทั้งในแง่ของปริมาณและคุณภาพเพื่อใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีต่อโปรตีนของไวรัสเด็งกี่ในซีรั่มผู้ป่วย โปรตีนแอนติเจนที่ใช้ควรมีต้นทุนในการผลิตต่อหน่วยต่ำ ผลิตได้ง่าย มีคุณสมบัติในการเป็นแอนติเจนที่ดี ทำปฏิกิริยาได้ดีกับแอนติบอดีจำเพาะ และสามารถละลายอยู่ได้แม้มีความเข้มข้นสูง ซึ่งจะเหมาะต่อการแปรรูปโปรตีนแอนติเจนเช่นการติดฉลากโปรตีนด้วยเอ็นไซม์ หรือสารเคมีอื่นๆที่จำเป็นต่อการพัฒนาชุดตรวจต่อไป ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการพัฒนาวิธีการผลิตหรือเตรียมโปรตีนรีคอมบิแนนต์ส่วนเปลือกหุ้ม(E) ของเด็งกี่ไวรัส ซีโรทัยป์ 2(6H-D2E) จาก E.coli เพื่อให้ได้โปรตีนที่มีคุณสมบัติเหมาะสมดังกล่าว เพื่อนำมาใช้เป็นแอนติเจนในชุดตรวจทดแทนการใช้แอนติเจนจากไวรัส

ในการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์จาก E.coli <pTrcHis/D2E> โปรตีน 6H-D2E จะถูกผลิตออกมาในรูปของ inclusion body ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาและเปรียบเทียบวิธีการ refolding โปรตีน และการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ 2 วิธี วิธีแรกเป็นการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยอาศัยหลักของ immobilized affinity chromatography <IMAC> ภายใต้สภาวะ denaturing condition และตามด้วยการ refolding โปรตีนบริสุทธิ์นั้น อีกวิธีหนึ่งเป็นการละลายโปรตีน inclusion ด้วยสารละลาย strong denaturants และทำการเจือจางโปรตีนใน refolding buffer ก่อนเพื่อเป็นการ refold โปรตีน จากนั้นจึงแยกโปรตีนออกจากกันตามขนาดด้วย gel filtration chromatography วิธีหลังให้โปรตีน 6H-D2E มากกว่าแต่ก็มี contaminants ปนมาด้วยเช่นกัน การแยกโปรตีนด้วยวิธี IMAC และตามด้วยการ refolding โดยวิธีการเจือจางโปรตีนใน refolding buffer ที่อุณหภูมิต่ำก่อนจะนำมาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย ultrafiltration เป็นวิธีการที่พบว่าให้ผลที่ดีทั้งในแง่ของผลผลิตที่ได้ และความเข้มข้นของโปรตีน โปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้มีการทำปฏิกิริยาที่ดีกับซีรั่มของผู้ป่วยไข้เลือดออก และโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน E ของเด็งกี่ไวรัส โดยวิธี indirect ELISA, Western blot หรือ dot-enzyme immunoassay และไม่ทำปฏิกิริยากับซีรั่มของคนปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนชุดนี้มีความเข้มข้นถึง 3 mg/ml ใน phosphate buffer saline <PBS> ที่ pH 7.4 และไม่พบว่ามีการตกตะกอนหลังจากผ่านการละลายจากการแช่แข็ง <freeze and thaw> ผู้วิจัยสามารถเตรียมโปรตีน 6H-D2E ได้ในปริมาณ และคุณภาพที่เหมือนเดิม จากการเตรียมหลายครั้ง แสดงว่าวิธีนี้มีความคงที่เหมือนเดิม จากการเตรียมหลายครั้ง แสดงว่าวิธีนี้มี

ความคงที่ และสามารพทำซ้ำได้ ขณะนี้ได้มีการนำโปรตีนรีคอมบิแนนต์ E ไปพัฒนาต่อเพื่อใช้เป็นแอนติเจนในชุดตรวจวินิจฉัยโรคไข้เลือดออกโดยบริษัทเอกชนทั้งในประเทศ และต่างประเทศ

คำสำคัญ : โปรตีนรีคอมบอแนนต์ 6H-D2E ,IMAC, การทำ refolding

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวธณิกานต์ ศิริพูลศฤงฆ์ เกิดวันที่ 23 ธันวาคม พ.ศ. 2523 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2545 และ เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547