



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการการสร้างดีเอ็นเอไวรัสดับอีกเสบชนิดซีที่แพร่ระบาดในปัจจุบัน

รศ. ดร. อุไรวรรณ อินทมาโส
นางสาวศรินทิพย์ รัฐกิจ
นายเอกชัย คงคาเดือด
นายวิทยา ภูมิภักดิ์
ดร. กนกพร ศรีสุจริตพานิช

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2559
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2559A10802094

สัญญาเลขที่ 30/2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการสร้างดีเอ็นเอวัคซีนต่อไวรัสตับอักเสบนชนิดซีที่แพร่ระบาดในปัจจุบัน

รศ. ดร. อุไรวรรณ อินทมาโส

นางสาวศิรินทิพย์ รัฐกิจ

นายเอกชัย คงคาเดียด

นายวิทยา ภูมิภักดิ์

ดร. กนกพร ศรีสุจริตพานิช

คณะสหเวชศาสตร์

29 มีนาคม 2560

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้สำเร็จลุล่วงด้วยดีเนื่องจากจากบุคคลหลายท่านที่ทุ่มเทร่างกายและใจในการทำงานวิจัยครั้งนี้ อาทิ นางสาวศรินทิพย์ รัฐกิจ และ นายเอกชัย คงคาเดือด นิสิตสาขาชีวเวชศาสตร์ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ senior project และนายวิทยา ภูมิภักดิ์ ศิษย์เก่าที่ให้ความช่วยเหลือทางด้านต่างๆ นอกจากนี้ขอขอบพระคุณ ศ.ดร. วิฑูรย์ ไวยนันท์ กรรมการผู้จัดการ บริษัทกรุงเทพพยาธิแล็บ จำกัด และโรงพยาบาลนครนายกที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างซีรัมผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบนิตซีเพื่อมาใช้ในการทดสอบ และท้ายสุดขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพาผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 30/2559

Construction of DNA vaccine to currently circulating hepatitis C virus

Uraiwan Intamaso^{*}, Sirintip Ratthakit, Ekkachai Khongkhaduead, Witthaya Poomipak,
Kanokporn Srisucharitpanit

Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Bangsaen, Chonburi

*Corresponding author: urawani@buu.ac.th

Hepatitis C is an infectious disease caused by the hepatitis C virus (HCV) that primarily affects the liver. Chronic hepatitis C (HCV) infection that can eventually progress to a more serious disease remains one of the most important clinical and public health problems facing modern medicine. This aim of present study was to identify HCV genotypes that were prevalent among the HCV patients and produce DNA vaccines against the high prevalent genotypes. A total of 67 sera samples from HCV infected patients were harvested and analyzed by one-step RT-PCR with primers specific for 5' UTR. The most prevalent genotype was g1 (49.25%) followed by g 6 (26.87%), g3 (22.39 %), and g4 (1.49 %). DNA fragment containing NS3/NS4A region of g3a or g6f were cloned into pVAX1 vector. Recombinant plasmids were analyzed by *Bam*HI/*Xba*I digestion, PCR และ DNA sequencing to confirm their authentication. Further study in gene expression and evaluation of vaccine efficacy would be required.

Key words: epidemiology, hepatitis C virus, genotype, DNA vaccine

การสร้างดีเอ็นเอวัคซีนต่อไวรัสตับอักเสบชนิดซีที่แพร่ระบาดในปัจจุบัน

นางสาวอุไรวรรณ อินทมาโส*, นางสาวศรินทิพย์ รัฐกิจ และ นายเอกชัย คงคาเดียด, นายวิทยา ภูมิภักดิ์,

นางสาวกนกพร ศรีสุจริตพานิช

¹ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน ชลบุรี

* ผู้เขียนที่เป็นชื่อหลัก: uraiwani@buu.ac.th

โรคตับอักเสบที่มีสาเหตุมาจากไวรัสตับอักเสบชนิดซีก่อให้เกิดปัญหาเริ่มต้นที่ตับ การติดเชื้อเรื้อรังที่สามารถพัฒนาไปเป็นโรคร้ายแรงขึ้นยังคงเป็นปัญหาทางคลินิกและสาธารณสุขที่ทำนายการรักษาในปัจจุบัน จุดมุ่งหมายของการศึกษานี้คือตรวจหาสายพันธุ์ของ HCV ที่ระบาดในกลุ่มผู้ติดเชื้อ HCV และสร้าง DNA vaccine เพื่อต่อต้าน HCV genotype ที่มีการแพร่ระบาดสูง ซึ่งรับจากผู้ติดเชื้อ HCV จำนวน 67 ตัวอย่างได้ถูกรวบรวมแล้วนำมาวิเคราะห์โดยเทคนิค one-step RT-PCR ด้วย primer ที่จำเพาะบริเวณ 5'UTR สายพันธุ์ g1 พบมากที่สุดร้อยละ 49.25 ตามด้วย g6, g3 และ g4 คิดเป็นร้อยละ 26.87, 22.39 และ 1.49 ตามลำดับ ชิ้นส่วน DNA ที่บริเวณ NS3/NS4A ของ g3a หรือ g6f ได้ถูกนำไป clone เข้า pVAX1 แล้ว recombinant plasmids ได้ถูกนำไปวิเคราะห์ ด้วยวิธี BamHI/XbaI digestion, PCR และ DNA sequencing เพื่อยืนยันความถูกต้อง การแสดงออกของ recombinant plasmid และประเมินประสิทธิภาพของวัคซีน จำเป็นต้องทำการศึกษาในขั้นต่อไป

คำสำคัญ: การระบาด, ไวรัสตับอักเสบชนิดซี, สายพันธุ์, ดีเอ็นเอวัคซีน

สารบัญ	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
สารบัญ	iv
สารบัญตาราง	v
สารบัญรูปภาพ	vi
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	vii
บทที่ 1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
สมมติฐานการวิจัย	2
ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	7
การเก็บตัวอย่างอุจจาระ	7
การสกัด HCV-RNA จากซีรัม	7
การตรวจสอบ genotypes ของ ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR	8
การสร้าง recombinant plasmid	9
การเพิ่มขยายชิ้นส่วน NS3/4A region ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR	9
Ligation และ การคัดเลือก recombinant plasmid	11
บทที่ 4 ผลการวิจัย	13
การตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของ HCV โดยใช้วิธี RT-PCR	13
การตรวจสอบ genotypes ของ HCV ด้วย DNA sequencing	13
การสร้าง HCV g3a recombinant plasmid	14
การสร้าง HCV g6f recombinant plasmid	17
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	21
อภิปรายผลการทดลอง	21
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	23
ผลผลิต (Output)	23
รายงานสรุปการเงิน	24
เอกสารอ้างอิง	25
ประวัติคณะผู้วิจัย	29

สารบัญตาราง (Table of Contents)

ตารางที่	หน้า
3.1 Primers ที่ใช้ในทดสอบหาสารพันธุกรรมของ HCV ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR	8
3.2 ปฏิกิริยา RT-PCR ที่ใช้ในทดสอบหาสารพันธุกรรมของ HCV	8
3.3 สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RT-PCR ด้วย thermocycler	9
3.4 Primer ที่ใช้ในการสร้าง recombinant plasmids	9
3.5 ปฏิกิริยา assembly PCR	10
3.6 สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา assembly PCR ด้วย thermocycler	11
4.1 แสดงผลการแยก genotype ของ HCV	14

สารบัญรูปภาพ (List of Illustrations)

รูปที่	หน้า
3.1 แผนผังการจับของ primer ที่บริเวณต่างๆ ใน NS3/4A region ของ HCV	10
3.2 แผนภาพของ pVAX 1 vector	12
4.1 แสดงขนาดของ cDNA ที่ได้จากการตรวจหาสารพันธุกรรมของ HCV	13
4.2 การทดสอบ annealing temperature ที่ใช้เพิ่มขยายชิ้นส่วน NS3/4A region ของ HCVg3a ด้วย primer HCV3_3376 และ HCV3_5500	15
4.3 แสดงขนาดน้ำหนักรหัสพันธุกรรมของ HCVg3a recombinant plasmid	16
4.4 แสดงผลการพิสูจน์ความถูกต้องของ HCVg3a recombinant plasmid จากการวิเคราะห์ด้วย <i>Bam</i> HI- <i>Xba</i> I digestion analysis	16
4.5 แสดงผลการพิสูจน์ความถูกต้องของ recombinant plasmid HCVg3a จากการวิเคราะห์ด้วย PCR	17
4.6 การทดสอบ annealing temperature ที่ใช้เพิ่มขยายชิ้นส่วน NS3/4A region ของ HCVg6f ด้วย HCV6_F4669 และ pVax1 HCV6_R5497	17
4.7 การทดสอบ annealing temperature ที่ใช้เพิ่มขยายชิ้นส่วน NS3/4A region ของ HCVg6f ด้วย pVax1 HCV6_F3393 และ HCV6_R4689 primer	18
4.8 การเพิ่มขยายสารพันธุกรรมของ HCV6f ขนาด 2104 bp ด้วย pVax1 HCV6_F3393 primer และ pVax1 HCV6_R5497 primer	18
4.9 แสดงขนาดน้ำหนักรหัสพันธุกรรมของ HCVg6f recombinant plasmid เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ pVax1 vector	19
4.10 แสดงผลการพิสูจน์ความถูกต้องของ HCVg6f recombinant plasmid จากการวิเคราะห์ด้วย <i>Bam</i> HI- <i>Xba</i> I digestion analysis	20
4.11 แสดงผลการพิสูจน์ความถูกต้องของ HCVg6f recombinant plasmid จากการวิเคราะห์ด้วย PCR	20

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

aa amino acid

bp base pair

cDNA complementary DNA

ELISA enzyme-linked sorbent assay

HCV hepatitis C virus

kDa kilodalton

PCR polymerase chain reaction

RT-PCR reverse transcription polymerase chain reaction

SVR sustained virological response

UTR untranslated region

บทที่ 1 บทนำ

การติดเชื้อด้วยไวรัสตับอักเสบชนิดซี (HCV) เป็นปัญหาสุขภาพที่เกิดขึ้นกับประชากรประมาณ 170 ล้านคนทั่วโลก (Lauer and Walker, 2001) สำหรับในประเทศไทยพบอุบัติการณ์ของ HCV ประมาณ 2.15% ของประชากรทั้งหมด (Sunanchaikarn, et al., 2007) โดยพบ 1-5 % ในกลุ่มผู้บริจาคเลือด (Kanistanon, et al., 1997, Jutavijittum, et al., 2009) ส่วนใหญ่ผู้ติดเชื้อหรือประมาณ 80% จะไม่แสดงอาการปรากฏออกมาเป็นระยะเวลาหลายปี อาจถึง 20-30 ปี (WHO, 2000) แต่เชื้อไวรัสยังคงแฝงอยู่ภายในร่างกายมีการพัฒนาของโรคอย่างช้าๆจนกลายเป็นโรคตับเรื้อรัง และรุนแรงขึ้นจนเกิดอาการตับแข็ง (cirrhosis) และ มะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma หรือ HCC) โดยการติดเชื้อด้วย HCV จะแตกต่างกับการติดเชื้อด้วยไวรัสตับอักเสบชนิดเอ (HAV) และบี (HBV) ที่เป็นการติดเชื้อแบบฉับพลันและมีโอกาสเกิดโรคตับแข็งและมะเร็งตับได้น้อยกว่า

HCV อยู่ในตระกูล *flaviviridae* และ genus *hepacivirus* มี genome เป็น RNA สายเดี่ยวเส้นบวก มีความยาวประมาณ 9,600 นิวคลีโอไทด์ เนื่องจากเป็น RNA virus จึงมีการกลายพันธุ์บน genome ได้ง่าย จากการวิเคราะห์ทางสายสกุล (phylogenetic analysis) สามารถแบ่ง HCV ออกได้เป็น 6 สายพันธุ์ (genotype) ได้แก่ genotype 1 ถึง 6 และสามารถแบ่งย่อยได้มากกว่า 83 subtypes ที่พบกระจายอยู่ทั่วโลก (Chao et. al., 2011) และในผู้ป่วยที่ติดเชื้อแต่ละรายอาจมีประชากรของ HCV ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความหลากหลายมาก (quasispecies) อยู่ภายในร่างกาย (Simmonds, 2004) นอกจากนี้ HCV ยังสามารถแฝงอยู่ภายในร่างกายจนก่อให้เกิดโรคเรื้อรัง (Alter and Seeff, 2000) รวมทั้งสามารถหลบเลี่ยงการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันได้ด้วย จากคุณสมบัติของ HCV ที่กล่าวมาทั้งหมดนี้จึงเป็นปัจจัยทำให้ไม่สามารถผลิตวัคซีนหรือยาที่มีประสิทธิภาพในป้องกันหรือรักษา HCV ได้ในปัจจุบัน

ปัจจุบันการรักษาผู้ติดเชื้อ HCV ใช้วิธีการให้ pegylated interferon- α (PEG-IFN) ร่วมกับ ribavirin ที่เป็น nucleotide analog แต่การรักษาที่ต้องใช้ระยะเวลานานประมาณ 24-48 สัปดาห์ อาจทำให้เกิดพิษกับผู้ป่วย จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าการใช้ PEG-IFN ร่วมกับ ribavirin มีประสิทธิภาพในการรักษาต่อ genotype ทั้งหมดของ HCV ได้เพียง 50% เท่านั้น และเมื่อใช้ PEG-IFN และ ribavirin ในการรักษา genotype 2/3 จะวัดค่า sustained virological response (SVR) (ค่าของ viral RNA ที่หายไปจากซีรัมซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงประสิทธิภาพของการรักษา) ได้ประมาณ 80-90% แต่เมื่อใช้กับ genotype 1 ซึ่งเป็น genotype ที่พบมากถึง 70% กลับมีผลเพียงแค่ 40-50% เท่านั้น (Manns et. al., 2001; Fried et al., 2002)

การสร้างวัคซีนเพื่อใช้ป้องกันไวรัสตับอักเสบชนิดซีนั้นเป็นงานท้าทายมาก ปัจจุบันการสร้างวัคซีนแบบทั่วไป (conventional vaccine) ซึ่งต้องใช้ไวรัสที่ active อยู่เป็นตัวตั้งต้นให้ผลของการตอบสนองน้อยมาก (Ulla et al., 2012) การป้องกันและควบคุมไวรัสตับอักเสบชนิดซีด้วย DNA วัคซีนน่าจะได้ผลดีกว่าวัคซีนชนิดอื่นๆ เพราะสามารถกระตุ้นการสร้างได้ทั้ง Humoral Immune response และ Cell Mediated Immune response และมีข้อดีที่สามารถออกแบบได้ตามต้องการ โดยสามารถออกแบบให้ต่อต้านไวรัสที่มีหลาย genotypes และหลายสายพันธุ์ได้ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมและยังสามารถเพิ่มปริมาณได้มากด้วย นอกจากนี้ยังมีความปลอดภัยมากเมื่อเปรียบเทียบกับวัคซีนชนิด attenuated หรือ inactivated vaccines

โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งหมายในการตรวจหา genotype ของ HCV ในผู้ติดเชื้อจากประชากรทั่วไปของประเทศไทย แม้ที่ผ่านมาจะมีผู้ได้เคยทำการทดสอบการแพร่ระบาดของ HCV มาแล้วแต่ข้อมูลที่ได้ไม่สามารถใช้เป็นตัวแทนของข้อมูลในปัจจุบันได้เนื่องจาก HCV มีการกลายพันธุ์ง่ายและสามารถเกิด recombination ได้ทำให้เกิด subtype ใหม่ๆ เกิดขึ้น ข้อมูลที่ได้จะทำให้ทราบถึงทางการกระจายของ genotype ต่างๆ (genotype distribution) ของ HCV ในปัจจุบันและชิ้นส่วนของยีนของ HCV บริเวณ NS3/NS4A ที่เป็น conserved region จาก genotype ที่แพร่ระบาดมากจะถูกนำไปสร้าง DNA vaccine เพื่อป้องกันการติดเชื้อ HCV genotype ที่พบมากในประเทศไทย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. การตรวจหา genotype ของ HCV ที่แพร่ระบาดในปัจจุบัน
2. การสร้าง DNA vaccine จากสายพันธุ์ที่แพร่ระบาดมาก

ทฤษฎี สมมติฐาน

จากการทดสอบหา genotype ของ HCV น่าจะทำให้ทราบรูปแบบการกระจายของ genotype ต่างๆ ของ HCV ที่แพร่ระบาดในประเทศไทยในปัจจุบัน เพราะการทดสอบการแพร่ระบาดของ HCV จากโครงการต่างๆ ที่มีผู้เคยทำมาแล้วอาจไม่ใช่สายพันธุ์ที่กำลังแพร่ระบาดในปัจจุบัน เนื่องจาก HCV เป็น RNA virus ที่มีการกลายพันธุ์ง่ายหรืออาจมีการ recombination ระหว่างสายพันธุ์ทำให้มี subtype ใหม่ๆ เกิดขึ้น และน่าจะสามารรถนำ NS3/NS4A ที่เป็นบริเวณ conserved region ไปสร้าง DNA vaccine ที่อาจจะจำเพาะต่อสายพันธุ์เดียวหรือต่อหลายๆสายพันธุ์พร้อมๆกัน

ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีการรวบรวมซีรัมจากผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบที่เข้ามาตรวจเลือดหรือติดตามการรักษาที่โรงพยาบาลนครนายกและบริษัทกรุงเทพพยาธิแล็บ จำกัด จำนวน 67 ราย โดยซีรัมได้ผ่านการทดสอบแล้วด้วยเทคนิค ELISA และนำมาสกัด HCV RNA เพื่อมาทำปฏิกิริยา one-step RT-PCR โดยใช้ primer จับจำเพาะที่บริเวณ 5' UTR หรือ core region และชิ้นส่วน cDNA ได้ถูกตรวจหา genotype ของไวรัสด้วย DNA sequencing analysis และชิ้นส่วน DNA บริเวณ NS3/NS4A ซึ่งเป็น conserved region ของยีนจาก HCV สายพันธุ์ที่พบว่ามีการแพร่ระบาดมากในประเทศไทย (3a หรือ 6f) ได้ถูกนำไปโคลนเข้า DNA vector จากนั้นตรวจคัดกรอง recombinant clones ด้วย restriction enzyme digestion analysis และ PCR และยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย DNA sequencing ก่อนนำไปใช้ทดสอบ in vivo ต่อไป

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบ genotype ของ HCV ที่กำลังแพร่ระบาดในปัจจุบัน
2. สร้าง DNA vaccine จากสายพันธุ์ที่แพร่ระบาดมากได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลการวิจัยสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านวิชาการโดยข้อมูลที่ได้จะทำให้ทราบถึง genotype ของ HCV ที่กำลังแพร่ระบาดในประเทศไทยในปัจจุบัน เพื่อไปใช้ประโยชน์ในการสร้าง DNA vaccine ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์เดียวหรือหลายๆสายพันธุ์พร้อมกัน ยังสามารถนำไปตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ อาทิ Journal of Medical Virology, Journal of Clinical Microbiology, Journal of General Virology และ Clinical and Molecular Hepatology เป็นต้นและ DNA vaccine ที่สร้างขึ้นสามารถนำจดสิทธิบัตรได้ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์คือกระทรวงสาธารณสุข

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

RNA Genome ของ HCV มีความยาวประมาณ 9600 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วยหนึ่ง open reading frame (ORF) มี untranslated region (UTR) ประกอบด้านข้างทั้งทางฝั่ง 3' และ 5' เมื่อ ORF ถูกถอดรหัสเป็น polypeptide มีความยาวประมาณ 3,000 amino acids หลังจากถูกตัดด้วย protease แล้ว สาย peptide จะถูกแบ่งย่อยออกเป็นโปรตีนชนิดต่างๆ ได้แก่ 3 structural proteins (core, E1 และ E2) และ 7 nonstructural proteins (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A และ NS5B) (Tang and Grise, 2009) จากหลักเกณฑ์การแบ่ง genotype ของ HCV ตามมาตรฐานสากลได้กำหนดให้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ 5' UTR ซึ่งเป็นบริเวณ conserved region เป็นเกณฑ์ในการแบ่ง หากบริเวณดังกล่าวมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันประมาณ 31-33% ไวรัสถูกแบ่งออกเป็น genotypes ต่างกันด้วยหลักเกณฑ์ดังกล่าวสามารถแบ่งแยก HCV ออกได้เป็น 6 genotypes โดยแต่ละ genotype มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ 5' UTR มีความจำเพาะกันและในแต่ละ genotype ยังสามารถถูกแบ่งย่อยออกเป็น subtype ต่างๆได้อีกโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ core gene ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการอนุลักษณะ เช่นกันแต่มีความหลากหลายมากกว่า 5' UTR โดยได้มีการกำหนดให้เป็นไวรัสต่าง subtype กันหากมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันประมาณ 20-25% (Simmonds et al., 1994, 2005) โดยข้อมูลจาก genotype ของ HCV มีความสำคัญมากทำให้ทราบถึงรูปแบบการกระจายของไวรัสไปยังภูมิภาคต่างๆ (geographic distribution) วิธีการแพร่ระบาด (mode of transmission) และผลการตอบสนองต่อการรักษาด้วย PEG-IFN และ ribavirin

Genotype 1, 2 และ 3 มีการกระจายอยู่ทั่วโลกและเป็นสาเหตุส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในผู้ป่วย โดยพบว่า subtype 1a และ 1b มีการระบาดมากที่สุด ในทวีปยุโรป อเมริกา และประเทศญี่ปุ่น ส่วน subtype 2a และ 2b พบมีการระบาดเป็นส่วนใหญ่ในประเทศญี่ปุ่น ทวีปอเมริกาเหนือและยุโรป นอกจากนี้ genotype 2 ยังพบได้ในประเทศอินเดีย สิงคโปร์ เวียดนาม และฟิลิปปินส์ด้วย ส่วน subtype 3a พบมากในประเทศแถบอินเดียและประเทศไทย ในทางตรงข้าม genotype 4, 5 และ 6 มีการพบระบาดได้น้อยกว่าและจำกัดเฉพาะในบางพื้นที่โดย genotype 5 พบในทวีปแอฟริกาใต้ genotype 4 พบมากในประเทศแถบตะวันออกกลางและ genotype 6 พบในประเทศจีนตอนใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Ndjomou et.al., 2003; Simmonds, 2004; Nguyen and Keefe, 2005)

การติดเชื้อด้วย HCV เกิดขึ้นผ่านทางเลือดในประเทศในกลุ่มที่พัฒนาแล้วมักมีการติดเชื้อผ่านทาง การฉีดสารเสพติด แต่ประเทศกำลังพัฒนาที่มีการติดต่อกับการฉีดสารเสพติดเช่นกันโดยเฉพาะ ประเทศไทยที่มีการติดต่อกับการฉีดสารเสพติดประมาณ 95% (Luksamijarulkul & Plucktaweesak, 1996) นอกจากนี้ยังมีการได้รับเชื้อผ่านการได้รับเลือด การฉีดวัคซีน การสักหรือการเจาะผิวหนัง การทำ hemodialysis รวมทั้งผ่านทางเพศสัมพันธ์ด้วย (Alter, 1994; Alter et.al., 1990) โดยวิธีการแพร่ระบาด มีความเกี่ยวข้องกับการกระจายของ genotype จากการศึกษาพบว่า HCV subtype 1a อาจมีการแพร่กระจายผ่านการให้เลือดและการปฏิบัติทางการแพทย์ที่ไม่ปลอดภัย subtype 1a และ 3a มีการระบาดมากในคนที่มีอายุ น้อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้เสพยาที่ใช้เข็มฉีดยา (injecting drug users หรือ IDUs) ในประเทศอเมริกา สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย รัสเซีย และประเทศไทย (Simmonds, 2004) และ genotype 4 และ 6 มีการติดต่อกับการเจาะหรือสักผิวหนัง ในประเทศที่กำลังพัฒนา (Kao, and Chen, 2000)

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าในประเทศไทยมีการระบาดของ HCV genotype 3a มากที่สุด ประมาณ 39-51% ในทุกพื้นที่ในประชากรทั่วไปและยังพบระบาดมากในผู้เสพยาเสพติดประมาณ 75-83% ของการติดเชื้อ HCV ส่วนอันดับรองลงมาคือ genotype 1 เช่น 1a, 1b และ 2a และ 6 (Theamboonlers, et. al., 2002; Kanistanon et. al., 1997) แต่ genotype 2 พบได้น้อยมาก เพราะเป็น genotype ที่พบน้อยในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ข้อมูลการระบาดของ genotype 2 ส่วนใหญ่จึงมาจากประเทศญี่ปุ่น เกาหลีใต้ จีนทางตอนเหนือและยุโรป อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าพบ genotype 2 ที่จังหวัดเชียงรายซึ่งตั้งอยู่ใกล้ชายแดนไทย-พม่าจึงอาจเป็นไปได้ว่า genotype 2 มีการแพร่ระบาดจากคนเมียนมาที่เดินทางข้ามชายแดนมายังฝั่งไทย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lewin และคณะ (Lewin et. al., 2007) ที่พบ genotype 2 ในประเทศเมียนมา สำหรับประเทศเพื่อนบ้านของเรา อาทิ เมียนมา ลาวและ เขมร พบมีการระบาดของ genotype 6 subtype ต่างๆ มากกว่า subtype 3a

HCV genotype 6 พบมากในประเทศทางแถบเอเชีย ได้แก่ ประเทศไทย ฮองกง อินโดนีเซีย เมียนมา และเกาหลี (Mellor et. al., 1996; Lao et al., 2001; Sugiyama et al., 1995; Tokita et. al., 1996; Lu et al., 2005; Nguyen et. al., 2004; Kanistanon et. al., 1997; Lewin et. al., 2007; Oh et. al., 2008) HCV genotype 6 มีทั้งหมด 21 subtypes ที่มีการตั้งชื่อตั้งแต่อักษร a ถึง u (Naamani et al., 2012) โดย subtype 6a พบระบาดในทิศตะวันตกเฉียงเหนือของทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ที่รวมถึงประเทศไทย (Sunanchaikarn, et. al. 2007; Theamboonlers, 2007; Shinji, et. al., 2004) และประเทศจีนทางตอนใต้เขตติดชายแดนเวียดนาม (Lu, et. al., 2005; Degertekin and Lok, 2007) และพบเด่นมากในประเทศเวียดนาม วิธีการแพร่ระบาดของ genotype 6 เกี่ยวข้องกับการใช้ฉีดยาเสพติดด้วยเข็มฉีดยาและผ่านการมีเพศสัมพันธ์ (Antaki et. al., 2010) สำหรับการระบาดของ subtype อื่นๆ ของ genotype 6 จะพบได้น้อยมาก มีลักษณะการระบาดเฉพาะในบางพื้นที่ (endemic transmission) อาทิ 6e และ 6l ที่พบในเวียดนาม 8.6% และ 1.4% ตามลำดับ (Pham, et. al., 2009) ส่วน 6c พบในประเทศเกาหลี 0.2% (Seong, et al., 2013) ซึ่งคล้ายกับที่พบในประเทศไทย ข้อมูลการระบาดของ genotype 6 มีการรายงานไว้น้อยมาก ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากการเก็บตัวอย่างอาจไม่สมบูรณ์หรือ low prevalence ในประชาชนในท้องถิ่นนั้นที่มีการสัมผัสเชื้อมายาวนานทำให้ภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ HCV ในระดับที่สูงมากจึงตรวจไม่พบเชื้อไวรัส นอกจากนี้หลายงานวิจัยได้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ 5'UTR แต่เพียงอย่างเดียวอาจทำให้พลาดในการตรวจพบ genotype 6 ได้ เพราะอาจมีการรายงานการตรวจพบเป็น genotype 1 เนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกันที่บริเวณนี้ ปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับ genotype 6 จึงมีน้อยมากทั้งเรื่องปัจจัยเสี่ยงและอาการทางคลินิก แต่มีการศึกษาหนึ่งได้รายงานว่าไม่มีความแตกต่างกันทางด้าน liver biochemistry, titers, cirrhosis และ ความเสี่ยงในการเกิด HCC ระหว่าง genotype 1 และ 6 (Seto et. al., 2008) ได้มีการรายงานว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ genotype 6 มีอาการที่ปรากฏออกมาน้อยและมีการตอบสนองดีต่อการรักษาด้วย interferon โดยมีค่า SVR ประมาณ 60-80% (Nguyen et. al., 2008; Fung et. al., 2008; Seong et. al., 2013) อย่างไรก็ตามที่เป็นเช่นนี้ยังไม่สามารถชี้ชัดได้ว่า genotype 6 มีความสามารถในการก่อให้เกิดพยาธิสภาพได้น้อย แต่อาจเป็นเพราะ genotype 6 ก่อให้เกิด atypical hepatitis ที่ยากต่อการตรวจพบก็เป็นได้

DNA vaccines เพื่อต่อต้านเชื้อ HCV ได้ถูกพัฒนาออกมาในหลายรูปแบบ Lin et al. (Lin et. al., 2008) ได้สร้าง alphaviral particle ที่สามารถ express gpE1, gpE2, NS3, NS4 และ NS5 ที่สามารถกระตุ้น cross reacting antibodies และสามารถต่อต้าน HCV ได้ใน BALB/c mice แต่มีปัญหาคือไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ใน human host cells และต้องมีการฉีดซ้ำหลายๆ ครั้ง ต่อมาได้มีการพัฒนา DNA

vaccine เพื่อจุดประสงค์ในการต่อต้าน HCV ให้มีประสิทธิภาพดีขึ้นและจำเพาะมากขึ้น โดยการออกแบบวัคซีนชนิด polytopic vaccines เป็นแบบ minigene ที่มีการแทรกชิ้นส่วนยีน H-2Dd (E2 protein) และ HLA-A-0201 (E1 และ core) เข้าไป plasmid vector ที่มีส่วนประกอบต่างๆ อาทิ immune enhancer elements, universal T helper epitope (PADRE), Endoplasmic reticulum signal sequence และ HBsAg genes เพื่อเพิ่มการ expression และ presentation ของ epitope ต่อ Th1 เพื่อกระตุ้น CD8+ T cells (Arashkia, et al., 2009) จากรายงานพบว่าสามารถกระตุ้น T cell response ได้สูงขึ้นและต่อต้าน HCV ได้ในหนูทดลอง นอกจากนี้ได้มีรายงานการนำ Bacillus calmete Gurein (BCG) มาใช้เป็น vector ร่วมกับ pDE22-CtEm และ pDE22-CS1 ด้วยการแทรกชิ้นส่วนของ Core, E2 และ CTL epitopes เข้าไป เพื่อพัฒนาเป็น DNA vaccine ต่อ HCV จากผลการทดลองพบว่า HCV epitope สามารถกระตุ้น cellular immunity ได้อย่างจำเพาะในหนู แต่การกระตุ้น humoral immune response ต่ำต่อ rBCG-CtEm เท่านั้น (Wei et al., 2008) และเช่นเดียวกับ structural gene ที่มีผู้นำมาใช้พัฒนาวัคซีนดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น non structural gene (NS) เช่น NS5a ได้ถูกนำมาใช้ในการพัฒนา DNA vaccine ด้วยและสามารถเพิ่มการกระตุ้น T cell response ได้เมื่อใช้ผสมกับ adjuvant (Masalovaa et al., 2009) ส่วน NS3 สามารถกระตุ้น T cell response ต่อ HCV ในผู้ติดเชื้อแบบฉับพลันและแบบเรื้อรังได้ (Cooper, et al., 1999) และยังสามารถเหนี่ยวนำการตอบสนองได้ทั้ง Class I และ classII restricted T cell response ด้วย (Shoukry et al., 2004)

บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างอุจจาระ

เก็บตัวอย่างเลือดที่เป็นพลาสมาหรือซีรัม (กรณีพลาสมาใช้ EDTA เป็นสารป้องกันเลือดแข็ง) จำนวนทั้งหมด 67 ตัวอย่าง จากผู้ป่วยที่เข้ารับการตรวจการติดเชื้อหรือติดตามผลการรักษาจากห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาลนครนายกจำนวน 9 ตัวอย่าง และ บริษัทกรุงเทพพยาธิแล็บ จำกัด จำนวน 58 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างเป็นเลือดที่เหลือจากการตรวจวิเคราะห์ในงานประจำโดยไม่มีข้อมูลเชื่อมโยงไปถึงประวัติคนไข้ นำตัวอย่างเลือดมาตรวจคัดกรองหา Antibody ต่อเชื้อ HCV (anti-HCV) โดยใช้เทคนิค ELISA และ automate ELISA reader (cobas anti-HCV) สำหรับตัวอย่างที่ให้ผล anti-HCV reactive จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C จนกว่าจะนำมาใช้ (หลีกเลี่ยงการ freeze-thaw)

3.2 การสกัด HCV-RNA จากซีรัม

สกัด RNA จากซีรัมของผู้ที่มี anti-HCV reactive โดยใช้ QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) นำ supernatant ปริมาตร 140 ไมโครลิตร ผสมกับ buffer AVL ปริมาตร 560 ไมโครลิตร ที่มี carrier RNA 5.6 ไมโครลิตรใน 1.5 ml microcentrifuge tube จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex เป็นเวลา 15 วินาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติม absolute ethanol ปริมาตร 560 ไมโครลิตร ผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันโดยใช้ vortex เป็นเวลา 15 วินาที spin down จากนั้นดูดส่วนผสมปริมาตร 630 ไมโครลิตร ลงใน spin column ที่ให้มากับชุดสกัด ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นระยะเวลา 1 นาที ที่ตั้งของเหลวที่อยู่ใน collection tube ทำซ้ำอีกครั้งจนส่วนผสมใน 1.5 ml microcentrifuge tube หมด จากนั้นดูด buffer AW1 ที่ผสม ethanol แล้ว ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่ตั้งของเหลวที่อยู่ใน collection tube ต่อมาเติม buffer AW2 ที่ผสม ethanol แล้ว ลงใน spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ที่ตั้งของเหลวที่อยู่ใน collection tube ทำการปั่นซ้ำอีกครั้งที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อกำจัด ethanol ที่ยังคงค้างอยู่ เปลี่ยน collection tube เป็น 1.5 ml microcentrifuge tube หลอดใหม่ จากนั้นเติม buffer AVE ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนใสที่มี RNA แบ่ง ใส่ใน 1.5 ml microcentrifuge tube หลอดละ 5 ไมโครลิตร เก็บใน -80°C จนกว่าจะนำมาใช้ทำการทดลองต่อไป

3.3 ตรวจสอบ genotypes ของ HCV ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR

การตรวจสอบ genotype ของ HCV-RNA ด้วยการทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้คู่ของ primer ที่จับจำเพาะบริเวณ 5'UTR ของ HCV ที่เป็น conserved region ของ HCV (ตารางที่ 3.1) ดังสถานะของปฏิกิริยา RT-PCR ที่แสดงไว้ในตารางที่ 3.2 และ 3.3 และ cDNA ผลผลิตที่ได้จะถูกนำวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen, USA) ในอัตราส่วน 1:10,000 จากการส่องดูภายใต้แสง UV โดย RT-PCR product คาดว่ามีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 279 bp จะถูกสกัดให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วย DNA sequencing เพื่อวิเคราะห์หา genotype ต่อไป

ตารางที่ 3.1 Primers ที่ใช้ในทดสอบหาสารพันธุกรรมของ HCV ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR

Primer	Sequence (5'→3')	Position	Product size
HCV Forward primer	CAC TCC CCT GTG AGG AAC TAC TGT	nt 36-59	279
HCV Reverse primer	GCACTCGCAAGCACCTATC	nt 296-315	

ตารางที่ 3.2 ปฏิกิริยา RT-PCR ที่ใช้ในทดสอบหาสารพันธุกรรมของ HCV

Components	1 reaction (25 µl)	Final conc.
DEPC (RNase-free water)	5.5	-
2X reaction mix	12.5	1X
5 mM MgSO ₄	2.0	0.4 mM
10 µM HCV Forward primer	1.0	0.4 µM
10 µM HCV Reverse primer	1.0	0.4 µM
SuperScript [®] III RT-PCR/ with Platinum [®] Taq mix	1.0	-
RNA template	2.0	-

ตารางที่ 3.3 สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RT-PCR ด้วย thermocycler

Conditions	Temperature (°C)	Time	Cycles
Pre-warmed	60	30 min	
Initial denaturation	94	3 min	
Denaturation	94	50 sec	35 cycles
Annealing	61.5	30 sec	
Extension	68	1 min	
Final extension	68	5 min	
Cool	4	-	

หมายเหตุ Annealing temperature = Tm primers - 5
Extension time 1min/1kb

3.4 การสร้าง recombinant plasmid

3.4.1 การเพิ่มขยายชิ้นส่วน NS3/4A region ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR

ชิ้นส่วน non-structural 3/4A (NS3/4A) region จะถูกเพิ่มขยายจำนวน ด้วย one-step RT-PCR โดยออกแบบ primer ให้สามารถจับจำเพาะที่บริเวณนี้ตาม genotype ของ HCV โดย primer ถูกออกแบบให้มีส่วนปลาย 5' และ 3' ประกอบด้วย restriction site ของ *Bam*HI และ *Xba*I ตามลำดับ (รูปที่ 3.1) เพื่อประโยชน์ในการ cloning เข้าไปภายใน pVAX1 vector (รูปที่ 3.2) นอกจากนี้ forward primer ยังมีส่วนของ ATG ถัดมาสำหรับใช้ในการแสดงออกของยีนด้วย (ตารางที่ 3.4)

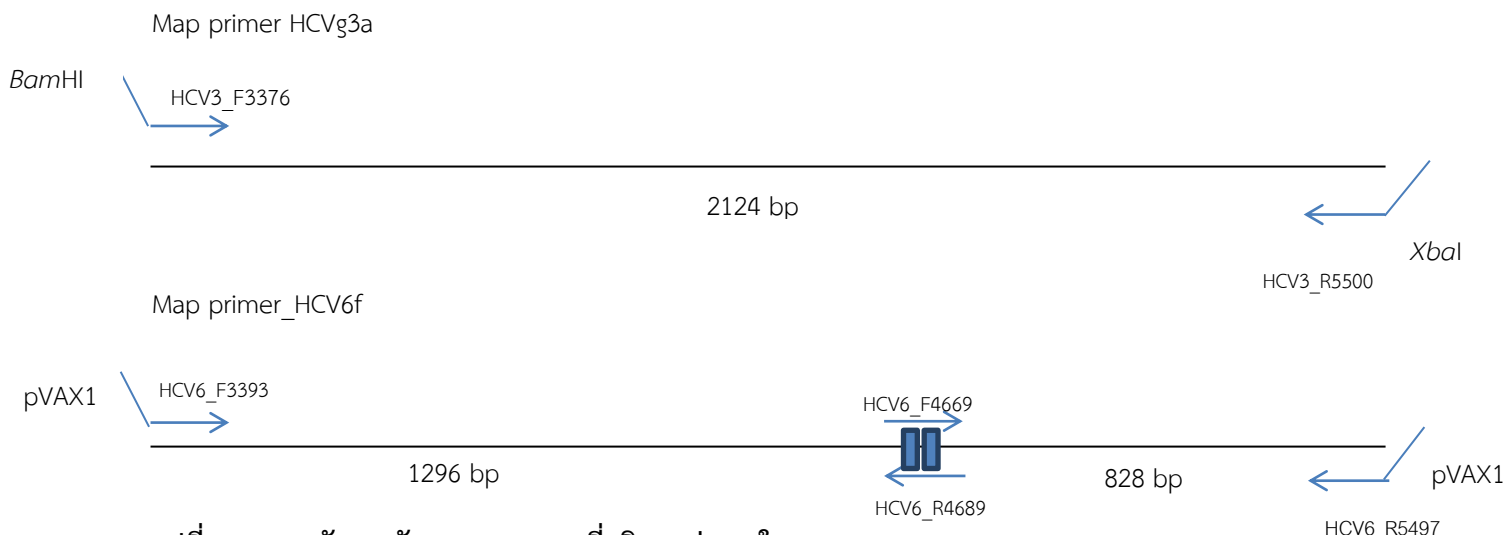
ตารางที่ 3.4 primer ที่ใช้ในการสร้าง recombinant plasmids

hcv Genotype	Primer_Name	Sequence	Tm	Position
3	HCV3_F3376	5'-GT <u>GGATCC</u> ATGAGGCCGTGAGGTGTTGTTGGG-3'	68	3376
	HCV3_R5500	5'- <u>ATCTAGA</u> CAGCTTGTGAGCACTCCTCCAT -3'	68	5500
6	HCV6_F4669	5'-GACGCCCTTATGACCGGCTAC-3'	68	4669
	HCV6_R4689	5'-GTAGCCGGTCATAAGGGCGTC-3'	68	4689
	pVax1 HCV6_F3393 <i>Bam</i> HI	5'-CTTGGTACCGAGCTC <u>GGATCC</u> ATGAAGAGCAAGGGCTG-3'	85	3393
	pVax1 HCV6_R5497 <i>Xba</i> I	5'-GGTTTAAACGGGCCCT <u>TCTAG</u> AGCTTAGAGCACTCCT-3'	77.3	5497

*Bam*HI>GGATCC

*Xba*I>TCTAGA

Start codon >ATG



รูปที่ 3.1 แผนผังการจับของ primer ที่บริเวณต่างๆ ใน NS3/4A region ของ HCV

การสร้าง HCV g3a recombinant plasmid ใช้ปฏิกิริยา one-step RT-PCR ที่สามารถเพิ่มขยายจำนวน ได้ผลผลิต cDNA เป็นชิ้นยาวประมาณ 2.1 kb ได้ในครั้งเดียว โดยใช้ primer HCV3_F3376 และ HCV3_R5500 แต่ในกรณีการสร้าง HCV g6f recombinant plasmid จำเป็นต้องใช้เทคนิค assembly PCR โดยการสร้างชิ้นส่วนของ cDNA ที่ละชิ้นด้วย one-step RT-PCR แล้วนำมาต่อเข้าด้วยกัน โดยเริ่มต้นสร้างชิ้นส่วน cDNA ขนาดประมาณ 828 bp จากการเพิ่มขยายจำนวนด้วยคู่ของ primer HCV6_F4669 และ pVax1 HCV6_R5497 แล้วนำไปต่อกับชิ้นส่วน cDNA ที่มีขนาดประมาณ 1296 bp ที่เพิ่มขยายจำนวนมาแล้วด้วย pVax1 HCV6_F3393 primer และ HCV6_R4689 โดยใช้เทคนิค assembly PCR ด้วยคู่ของ pVax1 HCV6_F3393 primer และ pVax1 HCV6_R5497 ได้ชิ้นส่วนของ NS3/4A region ครบทั้งชิ้นประมาณ 2.1 kb และยังมีส่วนจับจำเพาะที่ปลายทั้งสองข้างของ NS3/4A region ที่จับปลายทั้งสองข้างของ pVAX1 ด้วยประมาณ 15 bp เพื่อใช้ใน homologous recombination (In-Fusion cloning kit ; Clontech) ดังปฏิกิริยาที่แสดงไว้ในตารางที่ 3.5 และ 3.6 หลังจากได้ชิ้นส่วน DNA ของ NS3/4A region ของทั้ง g3a และ g6f แล้ว ชิ้นส่วนของ DNA ครบทั้งสายที่ยาวประมาณ 2.1 kb จะถูกสกัดให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป PureLink™ Quick PCR Purification Kit (Invitrogen, USA) ตามวิธีที่แนะนำมากับชุดทดสอบ ก่อนนำไป ligation ต่อไป

ตารางที่ 3.5 ปฏิกิริยา assembly PCR

Components	0.8 mM MgCl ₂ (50 µl)	1 mM MgCl ₂ (50 µl)	Final Conc.
H ₂ O	30.14	29.94	-
5X Phusion GC buffer	10	10	1X
10 mM dNTPs mix	1	1	0.2 mM
10 µM pVax1 HCV6_F3393 primer	2.5	2.5	0.5 µM
10 µM pVax1 HCV6_R5497 primer	2.5	2.5	0.5 µM

50 mM MgCl ₂	0.8	1	-
Phusion DNA Polymerase (2U/μl)	0.5	0.5	0.02 U
cDNA 1296 bp (30.1 ng/ul)	1.28	1.28	38.52 ng
cDNA 828 bp (30 ng/ul)	1.28	1.28	38.4 ng

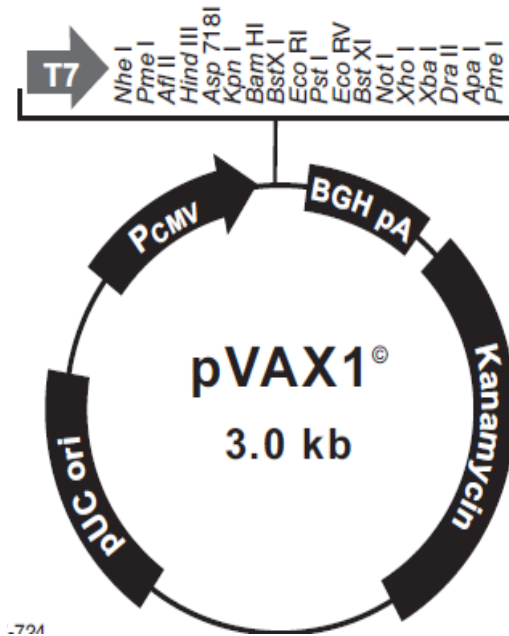
ตารางที่ 3.6 สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา assembly PCR ด้วย thermocycler

Conditions	Temperature (°C)	Time	Cycles
Initial denaturation	98	30 sec	
Denaturation	98	10 sec	35 cycles
Annealing	72.3	30 sec	
Extension	72	1 min 30 sec (40 sec/Kb)	
Final extension	72	10 min	
Cool	4	∞	

3.4.2 Ligation และ การคัดเลือก recombinant plasmid

DNA insert ของ HCVg3a หรือ HCV g6f ขนาดประมาณ 2.1 kb ได้ถูกนำไป insert เข้าไปภายใน pVAX1 vector สำหรับ HCVg3a ชิ้นส่วนของ DNA insert ถูกนำไปตัดด้วย *Bam*HI และ *Xba*I เพื่อนำไป clone เข้าไปใน pVAX1 vector (รูปที่ 3.2) ที่ถูกตัดแล้วด้วย *Bam*HI และ *Xba*I เช่นเดียวกัน โดยมีการเชื่อมต่อในอัตราส่วนของ insert: vector (molar mass)= 3:1 ด้วย T4 DNA ligase ส่วน HCVg6f ชิ้น DNA insert ได้ถูกนำไปแทรกเข้าไปภายใน *Bam*HI และ *Xba*I linearized pVAX1 ด้วย homologous recombination โดยไม่จำเป็นต้องตัด insert ด้วย *Bam*HI และ *Xba*I มาก่อน โดยชุดทดสอบ In-Fusion cloning kit (Clontech) ได้กำหนดให้มีการออกแบบ primer ที่นอกจากจับจำเพาะที่ปลายทั้งสองข้างของ NS3/4A region แล้วยังมีส่วนที่จับปลายทั้งสองข้างของ *Bam*HI และ *Xba*I linearized pVAX1 ประมาณ 15 bp ด้วยเพื่อใช้ใน homologous recombination ดังนั้น NS3/4A region ของ HCVg6f ต้องถูกเพิ่มขยายจำนวนด้วยคู่ของ primer pVax1 HCV6_F3393 *Bam*HI และ pVAX1 HCV6_R5497 *Xba*I (ตารางที่ 3.4) กอ่อดังในข้อ 3.4.1 และสกัดให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปผสมกับ vector ด้วยอัตราส่วน (mass) ของ insert ต่อ vector เท่ากับ 2:1 หรือประมาณ 100 ng: 50 ng ตามวิธีที่แนะนำ จากนั้นนำไป transform เข้าสู่ JM109 competent cells ด้วยวิธี heat shock แล้วคัดเลือก recombinant colonies ที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LA ที่มี 50 μg/ml kanamycin นำมาสกัด plasmid เพื่อพิสูจน์ความถูกต้องของชิ้น DNA insert โดยการตรวจคัดกรองขั้นแรกใช้วิธีการวิเคราะห์บน 0.8% agarose gel electrophoresis หากเป็น recombinant plasmid จะสังเกตเห็น

เคลื่อนที่ของ DNA ซ้ำลง (band shift) เมื่อเปรียบเทียบกับ pVAX1 vector ที่เคลื่อนที่ได้เร็วกว่า หลังจากนั้นนำมาพิสูจน์ต่อด้วยการตัดด้วย *Bam*HI และ *Xba*I digestion และ PCR และยืนยันความถูกต้องด้วย DNA sequencing ที่เป็นวิธีมาตรฐาน



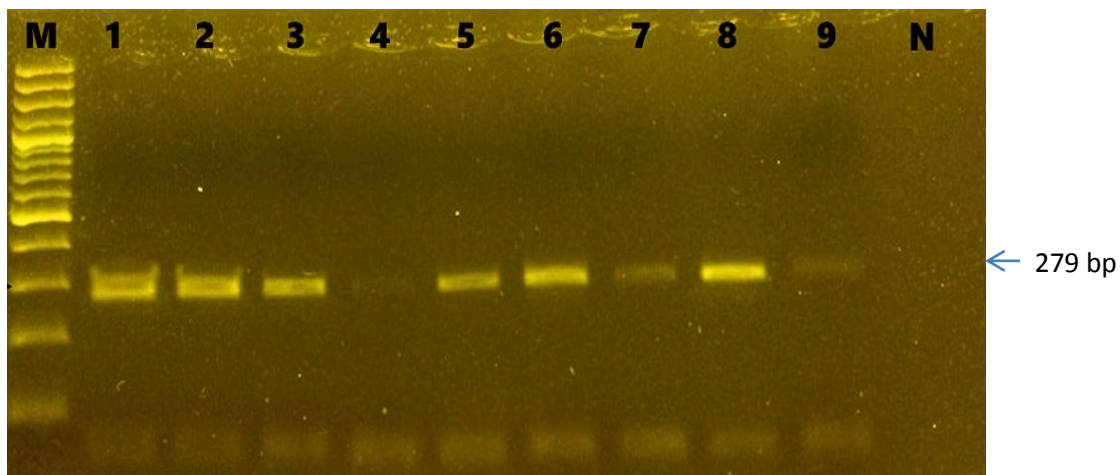
รูปที่ 3.2 แผนภาพ pVAX1 vector

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของ HCV โดยใช้วิธี RT-PCR

จากการตรวจวิเคราะห์หาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัส HCV ในตัวอย่างซีรัมของผู้ติดเชื้อด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ primer 1 คู่ คือ HCVUTR-F primer และ HCVUTR-R primer เพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมบริเวณ 5'UTR ของ HCV genome ซึ่งเป็นบริเวณ conserved region แล้วนำ cDNA ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาไปวิเคราะห์ด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis จากผลการทดสอบจำนวน 67 ตัวอย่างพบว่าทุกตัวอย่างมีการเพิ่มขยายสารพันธุกรรมของไวรัสได้ DNA เป้าหมายที่มีขนาดเป็นไปตามที่คาดประมาณ 279 bp จากการเปรียบเทียบกับ GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder maker (Thermo Scientific, USA) ดังในตัวอย่างที่สุ่มนำมาแสดงไว้ในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แสดงขนาดของ cDNA ที่ได้จากการตรวจหาสารพันธุกรรมของ HCV ในตัวอย่างที่ 1 – 9 ด้วยวิธี One-step RT-PCR โดย M คือ GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder maker, N คือ Negative control ที่ใช้น้ำแทนซีรัมและ 1-9 คือหมายเลขของแต่ละตัวอย่าง และลูกศรทางขวา คือขนาดของ DNA เป้าหมาย

4.2 การตรวจสอบ genotypes ของ HCV ด้วย DNA sequencing

หลังจากนำ cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR มาสกัดให้บริสุทธิ์แล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล ตัวอย่างทั้งหมด 67 ตัวอย่างมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น HCV จริง และสามารถจำแนกออกเป็น 4 genotypes โดยมีการเรียงลำดับตามความชุกจากมากไปหาน้อยได้แก่ genotype 1, 6, 3 และ 4 ที่มีความชุกคิดเป็นร้อยละ 49.25, 26.87, 22.39 และ 1.49 ตามลำดับ โดย

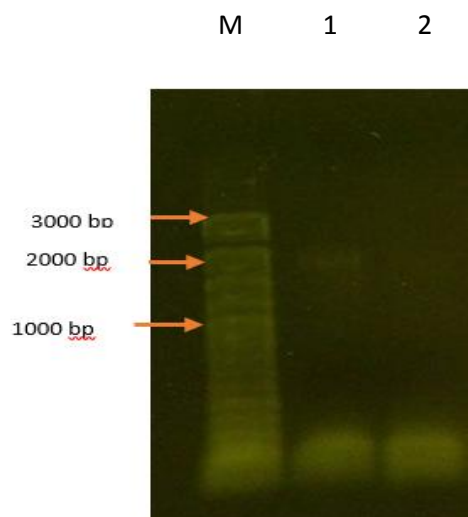
genotype 1 สามารถจำแนกออกเป็น subtype 1b และ 1a ที่มีความชุกเรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อยคิดเป็นร้อยละ 32.83 และ 16.42 ตามลำดับ ส่วน genotype 6 ที่มีความชุกคิดเป็นร้อยละ 26.87 สามารถจำแนกออกเป็น 6 subtypes ได้แก่ 6a, 6e, 6f, 6h, 6n, และ 6o โดยที่ 6f มีความชุกมากที่สุด ใน genotype 6 คิดเป็นร้อยละ 11.94 ส่วน genotype 3 เช่นกันคิดเป็นร้อยละ 22.39 สามารถจำแนกออกเป็น 2 subtypes ได้แก่ 3a และ 3b ที่มีความชุกเรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อยคิดเป็นร้อยละ 17.91 และ 4.48 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบ genotype 4 เพียง 1 ตัวอย่าง ซึ่งมีความชุกคิดเป็นร้อยละ 1.49 ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 : แสดงผลการแยก genotype ของ HCV โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับ ข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในธนาคารรหัสพันธุกรรม (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST ของตัวอย่าง ทั้งหมด 67 ตัวอย่าง

Genotype		จำนวนตัวอย่างที่พบ	คิดเป็นร้อยละ	รวม
1	1a	11	16.42	33 (49.25%)
	1b	22	32.83	
6	6a	2	2.99	18 (26.87%)
	6e	1	1.49	
	6f	8	11.94	
	6h	1	1.49	
	6n	3	4.48	
	6o	3	4.48	
3	3a	12	17.91	15 (22.39%)
	3b	3	4.48	
4	4a	1	1.49	1 (1.49%)

4.3 การสร้าง HCV g3a recombinant plasmid

NS3/4A region ของ HCVg3a จะถูกนำมาเพิ่มขยายจำนวนด้วย one-step RT-PCR โดยการผันแปรที่ annealing temperature ต่างๆ จากผลการทดลองพบว่า annealing temperature ที่ 60°C สามารถเพิ่มผลิต cDNA ที่มีขนาดขึ้นประมาณ 2.1 kb ได้ดี แต่ที่ 62.5°C กลับไม่พบแถบ DNA (รูปที่ 4.2) ดังนั้นจึงใช้ annealing temperature ที่ 60°C สำหรับคู่ของ primer HCV3_3376 และ HCV3_5500 ในการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 4.2 การทดสอบ annealing temperature ที่ใช้เพิ่มขยายชิ้นส่วน NS3/4A region ของ HCVg3a ด้วย primer HCV3_3376 และ HCV3_5500 จากการวิเคราะห์ปริมาณของ cDNA ผลผลิตจากปฏิกิริยา one step RT-PCR บน 0.8% agarose gel electrophoresis

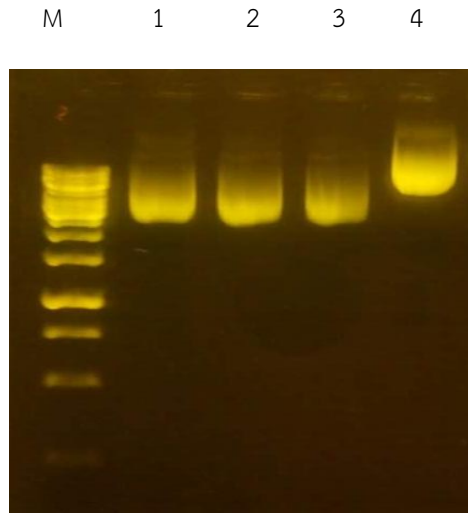
Lane M : DNA Ladder marker 100 bp

Lane 1 : cDNA 2.1 kb ที่ annealing temp 60 °C

Lane 2 : cDNA 2.1 kb ที่ annealing temp 62.5 °C

ชิ้นส่วน NS3/4A region ของ HCVg3a ที่ได้จะถูกนำไปเชื่อมต่อเข้าไปที่ *Bam*HI และ *Xba*I site ของ linearized pVAX1 เมื่อนำไป transform เข้า JM109 มีการคัดเลือก 3 recombinant colonies ที่เจริญได้บน LA ที่มี 50 μ g/ml kanamycin ผลจากการสกัด plasmid แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis พบว่า recombinant no 3 มี plasmid ที่น่าจะมีชิ้น DNA insert เมื่อเปรียบเทียบกับ pVAX1 vector (รูปที่ 4.3)

จากการตรวจสอบความถูกต้องของชิ้น DNA insert ที่ clone เข้าไปภายใน pVAX1 vector จากการตัดด้วย *Bam*HI และ *Xba*I พบแถบ DNA ขนาดประมาณ 2.1 kb (รูปที่ 4.4) ซึ่งสอดคล้องกับผลจาก PCR ที่สามารถเพิ่มขยายชิ้นส่วน NS3/4A region ของ HCVg3a ที่มีขนาดประมาณ 2.1 kb ได้ เมื่อใช้ primer HCV3_3376 และ HCV3_5500 (รูปที่ 4.5) และเมื่อนำ recombinant plasmid ไปยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี DNA sequencing พบว่า recombinant plasmid no 3 มี ชิ้นส่วนของ DNA insert เป็น HCVg3a จริง (ไม่ได้แสดงผล)

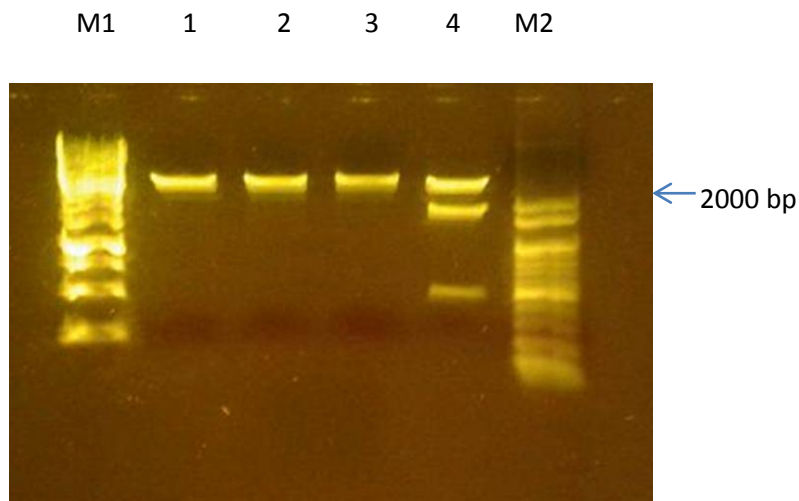


รูปที่ 4.3 แสดงขนาดน้ำหนักโมเลกุลของ HCVg3a recombinant plasmid เมื่อนำมาเปรียบกับ pVAX1 vector จากวิเคราะห์ด้วย 0.8% Agarose gel electrophoresis

Lane M: 1 Kb marker

Lane 1 : pVAX1 vector

Lane 2-4: Recombinant 1-3, ตามลำดับ

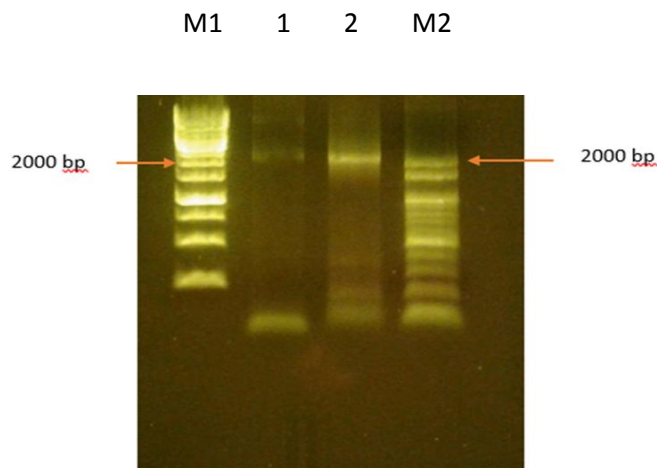


รูปที่ 4.4 แสดงผลการพิสูจน์ความถูกต้องของ HCVg3a recombinant plasmid จากการวิเคราะห์ด้วย *Bam*HI-*Xba*I digestion analysis บน 0.8% agarose gel electrophoresis

M1 และ M2: 1 Kb และ 100 bp marker ตามลำดับ

Lane 1: pVAX1

Lane 2-4: Recombinant no 1-3, ตามลำดับ



รูปที่ 4.5 แสดงผลการพิสูจน์ความถูกต้องของ recombinant plasmid HCVg3a

จากการวิเคราะห์ด้วย PCR บน 0.8% agarose gel electrophoresis

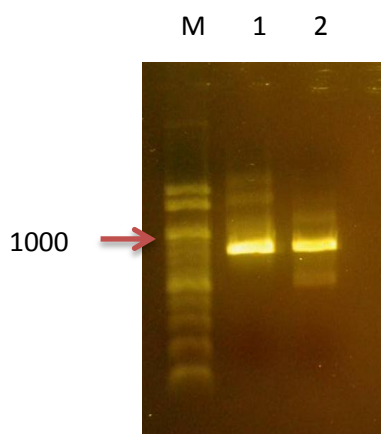
M1 และ M2: 1 Kb และ 100 bp marker, ตามลำดับ

Lane 1: recombinant plasmid no 3

Lane 2: 2.1 kb cDNA (positive control)

4.4 การสร้าง HCV g6f recombinant plasmid

NS3/4A region ของ HCVg6f จะถูกนำมาเพิ่มขยายจำนวนเทคนิค assembly RT-PCR โดยเริ่มสร้างชิ้นส่วนของ cDNA ที่มีขนาดประมาณ 828 bp ก่อนด้วย primer HCV6_ F4669 และ pVax1 HCV6_ R5497 โดยที่ reverse primer มีชิ้นส่วนที่จับจำเพาะที่ pVAX1 vector ด้วย ผลจากการทดสอบพบว่า ที่ annealing temperature 63.6 °C และ 71.6 °C สามารถเพิ่มขยายจำนวนได้ผลผลิตปริมาณพอๆ กัน (รูปที่ 4.6)



รูปที่ 4.6 การทดสอบ annealing temperature ที่ใช้เพิ่มขยายชิ้นส่วน NS3/4A region ของ

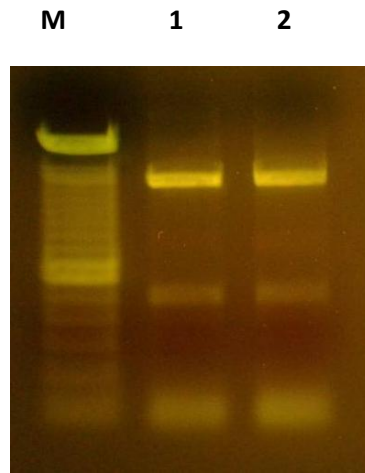
HCVg6f ด้วย HCV6_ F4669 และ pVax1 HCV6_ R5497 จากการวิเคราะห์ปริมาณของ cDNA ผลผลิตจากปฏิกิริยา one step RT-PCR บน 0.8% agarose gel electrophoresis

Lane M : DNA Ladder marker 100 bp

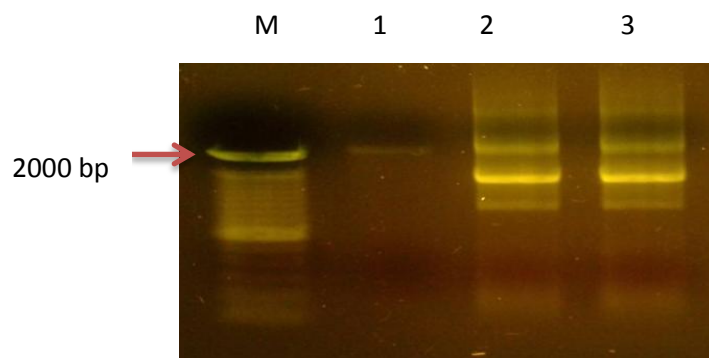
Lane 1 : cDNA 828 bp ที่ annealing temp 63.6 °C

Lane 2 : cDNA 828 bp ที่ annealing temp 71.6 °C

ในทำนองเดียวกันเมื่อนำ pVax1 HCV6_F3393 ที่สามารถจับจำเพาะที่ pVAX1 vector ได้ และ HCV6_R4689 primer มาเพิ่มขยายชิ้นส่วนของ HCV DNA ผลจากการผันแปร annealing temperature พบว่า ที่ 52.6 °C และ 63.6 °C สามารถเพิ่มขยายจำนวนได้ผลผลิตประมาณ 1296 bp ที่มีปริมาณพอๆ กัน (รูปที่ 4.7) หลังจากการนำแต่ละชิ้นส่วนของ cDNA มา assembly กันเทคนิค assembly PCR และปรับสภาวะด้วยการเติม MgCl₂ พบว่า สภาวะของปฏิกิริยาที่เติมด้วย 0.8 และ 1 mM MgCl₂ ให้ผลผลิตชิ้นส่วนของ DNA บริเวณ NS3/NS4A ขนาดประมาณ 2.1 kb ปริมาณพอๆ กัน (รูปที่ 4.8) ที่พร้อมนำไปใช้ในการ cloning ต่อไป

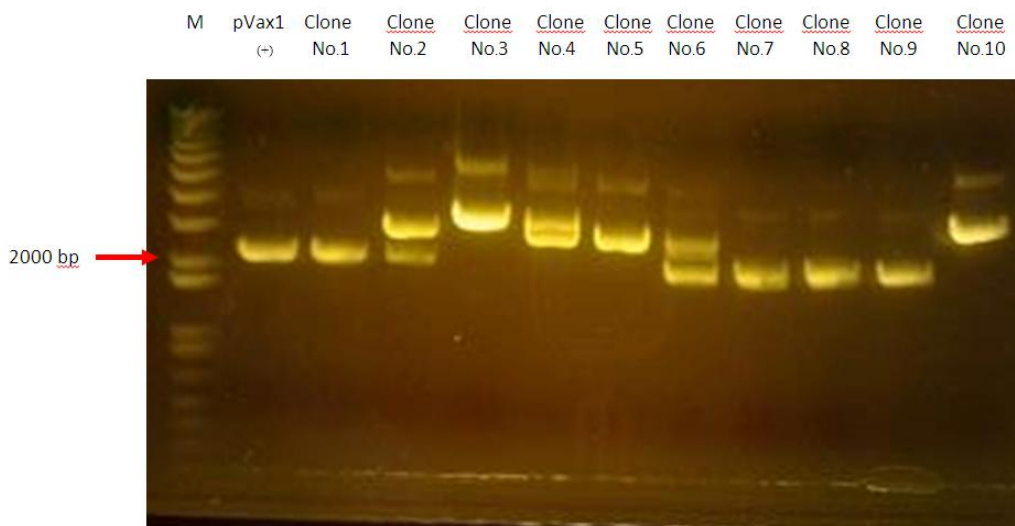


รูปที่ 4.7 การทดสอบ annealing temperature ที่ใช้เพิ่มขยายชิ้นส่วน NS3/4A region ของ HCVg6f ด้วย pVax1 HCV6_F3393 และ HCV6_R4689 primer จากการวิเคราะห์ปริมาณของ cDNA ผลผลิตจากปฏิกิริยา one step RT-PCR บน 0.8% agarose gel electrophoresis
Lane M : DNA Ladder marker 100 bp
Lane 1-2 : cDNA 1296 bp ที่ annealing temp 52.6°C และ 63.6°C ตามลำดับ

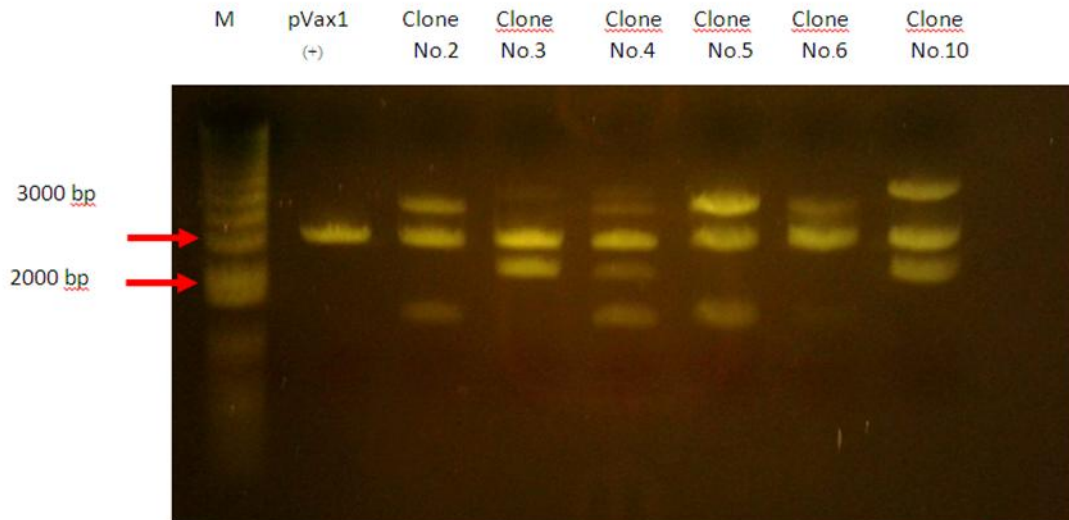


รูปที่ 4.8 การเพิ่มขยายสารพันธุกรรมของ HCV6f ขนาด 2104 bp ด้วย pVAX1 HCV6_F3393 primer และ pVAX1 HCV6_R5497 primer
Lane M : DNA Ladder marker 100 bp
Lane 1 : cDNA 2104 bp (positive control)
Lane 2-3 : DNA 2104 bp ด้วย MgCl₂ 0.8 และ 1 mM ตามลำดับ

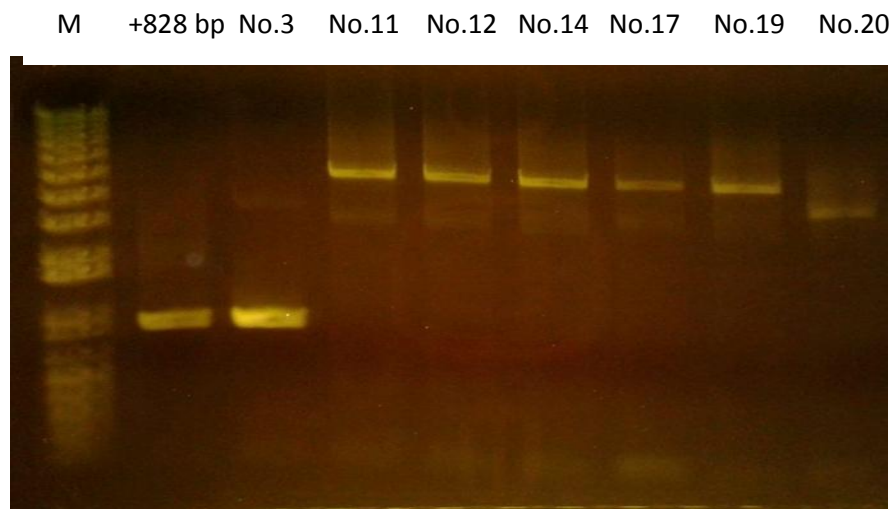
ชิ้นส่วน NS3/4A region ของ HCVg6f ที่ได้จะถูกนำไปผสมกับ *Bam*HI และ *Xba*I linearized pVAX1 เมื่อนำไป transform เข้า JM109 แล้วคัดเลือก 20 recombinant colonies ที่เจริญได้บน LA ที่มี 50 μ g/ml kanamycin ผลจากการสกัด plasmid แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis พบว่า recombinant no 2,3,4,5,6 และ 10 มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า pVAX1 vector (รูปที่ 4.9) และเมื่อนำ recombinant เหล่านี้ไปตรวจสอบด้วย *Bam*HI และ *Xba*I digestion analysis พบว่า recombinant no 3 เท่านั้นได้แถบ DNA 2 แถบ ที่มีขนาดประมาณ vector และ NS3/4A region ที่มีขนาดประมาณ 2.1 kb (รูปที่ 4.10) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลจาก PCR ที่สามารถขยายชิ้นส่วน NS3/4A region ของ recombinant no 3 ได้ขนาดประมาณ 828 bp เมื่อใช้ primer HCV6_ F4669 และ pVAX1 HCV6_ R5497 (รูปที่ 4.11) และเมื่อนำ recombinant plasmid ไปยืนยันความถูกต้องของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี DNA sequencing พบว่า recombinant plasmid no 3 มี ชิ้นส่วนของ DNA insert เป็น HCVg6f จริง (ไม่ได้แสดงผล)



รูปที่ 4.9 แสดงขนาดน้ำหนักโมเลกุลของ HCVg6f recombinant plasmid เมื่อนำมาเปรียบกับ pVAX1 vector จากวิเคราะห์ด้วย 0.8% Agarose gel electrophoresis โดยที่ M = 1 Kb marker



รูปที่ 4.10 แสดงผลการพิสูจน์ความถูกต้องของ HCVg6f recombinant plasmid จากการวิเคราะห์ด้วย *Bam*HI-*Xba*I digestion analysis บน 0.8% agarose gel electrophoresis
 M1 : 100 bp marker
 Lane 1: pVAX1
 Lane 2-7 : recombinant plasmid ต่างๆ



รูปที่ 4.11 แสดงผลการพิสูจน์ความถูกต้องของ HCVg6f recombinant plasmid จากการวิเคราะห์ด้วย PCR บน 0.8% agarose gel electrophoresis
 M : 100 bp marker
 Lane 1: 828 bp cDNA (positive control)
 Lane 2-8 : recombinant plasmid no ต่างๆ

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

ไวรัสตับอักเสบชนิดซี (HCV) เป็นไวรัสที่มีการกลายพันธุ์สูงมาก สามารถแบ่งออกได้เป็นหลายสายพันธุ์และยังแบ่งย่อยออกได้หลาย subtypes อย่างไรก็ตาม HCV ยังมีบริเวณที่มีการอนุรักษ์ไว้ที่ 5'UTR ที่ใช้เป็น internal ribosome entry site (IRES) จึงสามารถใช้บริเวณนี้ในการพิสูจน์การติดเชื้อ HCV ได้ จากตัวอย่างซีรัมทั้งหมดจำนวน 67 ตัวอย่าง ที่เก็บจากผู้ป่วยที่เข้ามาตรวจเลือดหรือติดตามผลการรักษาที่โรงพยาบาลนครนายกที่ตั้งในภาคกลางจำนวน 9 ตัวอย่างหรือบริษัทกรุงเทพพยาธิแล็บจำกัดที่รับตรวจเลือดทั่วประเทศ โดยเลือดได้ผ่านการทดสอบเบื้องต้นแล้วด้วยเทคนิค ELISA เมื่อนำมายืนยันการติดเชื้อด้วยเทคนิค One step RT-PCR พบแถบ cDNA ที่มีขนาดประมาณ 279 bp ตามที่คาด จึงเป็นการยืนยันการติดเชื้อ HCV จริง เมื่อนำแถบ cDNA ไปสกัดให้บริสุทธิ์และนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล พบว่าตัวอย่างทั้งหมด 67 ตัวอย่างมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นของ HCV จริง และสามารถจำแนกออกเป็น 4 genotypes โดยมีการเรียงลำดับตามความชุกจากมากไปหาน้อยได้แก่ genotype 1, 6, 3 และ 4 ที่มีความชุกคิดเป็นร้อยละ 49.25, 26.87, 22.39 และ 1.49 ตามลำดับ และเนื่องจาก HCV มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากจึงสามารถจำแนกออกเป็น subtypes ต่างๆ ได้ โดย genotype 1 ที่พบมีการระบาดทั่วโลก และพบมากที่สุดจากผลการวิจัยในครั้งนี้นี้ด้วย สามารถจำแนกออกเป็น subtype 1b และ 1a ที่มีความชุกเรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อยคิดเป็นร้อยละ 32.83 และ 16.42 ตามลำดับ ส่วน genotype 6 ที่พบมากในประเทศไทยและทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีความชุกคิดเป็นร้อยละ 26.87 สามารถจำแนกออกเป็น 6 subtypes ได้แก่ 6a, 6e, 6f, 6h, 6n, และ 6o โดยที่ 6f มีความชุกมากที่สุดในการศึกษาครั้งนี้ คิดเป็นร้อยละ 11.94 ส่วน genotype 3 ที่พบระบาดมากในทวีปเอเชียและเคยเป็น genotype ที่เคยพบมากที่สุดกลับพบมีความชุกเป็นอันดับ 3 จากงานวิจัยนี้ คิดเป็นร้อยละ 22.39 โดยสามารถจำแนกออกเป็น 2 subtypes ได้แก่ 3a และ 3b ที่มีความชุกเรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อยคิดเป็นร้อยละ 17.91 และ 4.48 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบ genotype 4 เพียง 1 ตัวอย่าง ซึ่งปกติพบน้อยอยู่แล้วมีค่าความชุกคิดเป็นร้อยละ 1.49 จากข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยที่มีรายงานก่อนหน้านี้ว่า genotype 6 และ 3 เป็น genotype ที่มีการแพร่ระบาดมากในทวีปเอเชียรวมทั้งประเทศไทยด้วยและยังไม่มีการผลิต DNA vaccine ที่ต่อต้านสายพันธุ์ทั้งสอง ดังนั้นจึงเลือก genotype 3a และ 6f มาทำ DNA vaccine ด้วยการสร้าง recombinant plasmid ที่มีชิ้นส่วนของ DNA ประกอบด้วย NS3/NS4A region และ insert เข้าไปภายใน pVAX1 vector โดย NS3 เป็นโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 67 kDa จัดเป็น multifunctional activity ประกอบไปด้วย NS3 serine proteinase domain อยู่ในส่วนของ N-terminal ที่ประกอบด้วย 189 aa ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องในการตัดแยกโปรตีนระหว่าง NS3-4A, 4A-4B, 4B-5A และ 5A-5B ส่วน NTPase/helicase อยู่ในส่วนของ C-terminal ที่ประกอบด้วย 442 aa มีบทบาทต่อ RNA-stimulated NTPase activity, RNA binding และการคลายเกลียวของ RNA ทำให้เกิด RNA replication เกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ ส่วน NS4A protein เป็นโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 8 kDa มีทั้งหมด 54 aa จัดเป็น cofactor สำหรับ NS3 serine protease activity

ทำให้เกิด NS3-4A complex ดังนั้นการสร้าง DNA vaccine ต่อ NS3-4A complex จึงมีบทบาทสำคัญในการขัดขวาง replication ของไวรัสได้

การเพิ่มขยายจำนวนชิ้นส่วน DNA บริเวณ NS3/4A ของ HCVg3a ด้วย one-step RT-PCR จำเป็นต้องมีการออกแบบ primer ให้ปลายสายมี restriction site สำหรับตัดด้วย *Bam*HI ที่ปลาย 5' และ *Xba*I ที่ปลาย 3' หลังจากถูกตัดด้วย enzyme ดังกล่าวจะได้ sticky end ที่สามารถต่อกับ *Bam*HI/*Xba*I linearized pVAX1 ที่ตำแหน่งเดียวกันได้ และต้องมี ATG เพื่อการแสดงออกของยีน ผลจากการเพิ่มขยายจำนวน annealing temperature ที่ 60°C พบว่า สามารถเพิ่มขยายจำนวนชิ้นส่วน DNA เป้าหมายได้ขนาดประมาณ 2.1 kb เมื่อนำไป clone เข้า pVAX1 ที่ตำแหน่งดังกล่าว และ transform เข้า JM109 แต่เนื่องจาก enzyme ทั้งสองมีการตัดไม่สมบูรณ์ จากการทดสอบนำ-vector ที่ผ่าน *Bam*HI , *Xba*I single digestion รวมทั้ง *Bam*HI/*Xba*I double digestion มา transform เข้าไปภายใน โฮสต์เซลล์ พบหลายๆ colonies ที่สามารถเจริญได้บน 50 µg/ml LA เนื่องจากผลจากการตัดด้วย enzyme ที่ไม่สมบูรณ์ทำให้ได้ vector กลับมาปะปนอยู่กับ recombinant plasmids การเพิ่มเวลาในการตัด enzyme ตลอดคืนไม่สามารถทำได้ เพราะอาจทำให้ตำแหน่งที่ตัดด้วย enzyme เสียไปจนไม่สามารถนำไป cloning ได้ นอกจากนี้การ cloning เข้าไปใน pVAX1 vector จำเป็นต้องอาศัย antibiotic selection เพียงเดียวจึงทำให้การคัดเลือก recombinant plasmid มีความยากลำบากมากขึ้น อย่างไรก็ตาม หลังจากการ cloning ที่ตำแหน่ง *Bam*HI/*Xba*I site พบมี recombinant colony เพียง 1 ใน 30 colony หลังจากพิสูจน์ความถูกต้องของชิ้น DNA insert ด้วยวิธี *Bam*HI/*Xba*I digestion, PCR และ DNA sequencing สามารถยืนยันได้ว่าชิ้น DNA insert ที่ใส่เข้าไปเป็น NS3/4A ของ HCVg3a จริง จากผลการทดลองทั้งหมดชี้ให้เห็นว่าการ cloning ด้วยวิธีดั้งเดิมแบบ enzyme digestion และ ligation มีประสิทธิภาพต่ำ

สำหรับ HCV 6f ใช้วิธีการเพิ่มขยายจำนวนชิ้นส่วน DNA บริเวณ NS3/4A ด้วยเทคนิค assembly PCR เพิ่มขยายชิ้นส่วน DNA ทีละชิ้นด้วย RT-PCR แล้วนำ cDNA มาต่อเข้าด้วยกัน วิธีนี้มีข้อดีในกรณีที่ชิ้นส่วนของ insert มีขนาดยาวมาก และเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการตัดด้วย enzyme ที่ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นจึงใช้วิธีการ cloning ที่แตกต่างไปจากของ g3a ด้วยการใช้ In-Fusion cloning kit (Clontech) ที่กำหนดให้มีการออกแบบให้ปลายสายทั้งสองข้าง มีส่วนเหมือนกับ vector บริเวณที่จะ insert ประมาณ 15 bp เพื่อใช้ในการ homologous recombination แทนการเชื่อมต่อด้วย enzyme ligase อย่างไรก็ตาม pVAX1 จำเป็นต้องผ่านการตัดให้เป็นเส้นตรงก่อนด้วย *Bam*HI และ *Xba*I ก่อน จากการทดลองได้ 1 recombinant plasmid จากการคัดเลือกมาจำนวน 20 colonies หลังจากพิสูจน์ความถูกต้องของชิ้น DNA insert ด้วยวิธี *Bam*HI/*Xba*I digestion, PCR และ DNA sequencing สามารถยืนยันได้ว่าชิ้น DNA insert ที่ใส่เข้าไปเป็น NS3/4A ของ HCVg6f จริง อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถสรุปได้ว่า การ cloning แบบ recombination นี้มีประสิทธิผลดีกว่าการ cloning แบบดั้งเดิม แต่คาดว่าหลังจากตัด vector ด้วย enzyme ทั้งไว้ตลอดคืนจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการ cloning ได้ดีขึ้น โดยไม่ผลการกระทบต่อการ recombination เพราะไม่ได้ใช้ตำแหน่งตัด enzyme ในการเชื่อมต่อ

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากตัวอย่างทั้งหมด 67 ตัวอย่าง สามารถจำแนก HCV ออกเป็น 4 genotypes ได้แก่ genotype 1, 6, 3 และ 4 ที่มีความชุกคิดเป็นร้อยละ 49.25, 26.87, 22.39 และ 1.49 ตามลำดับ และ genotype 3a หรือ 6f ที่มีความชุกมากที่สุด ใน genotype 3 และ 6 ตามลำดับ หลังจากนั้นนำไป clone เข้า pVAX1 ได้ recombinant plasmid ได้ผ่านการพิสูจน์แล้วมี DNA insert ที่เป็นชิ้นส่วน DNA ที่ประกอบด้วย NS3/NS4A ของ HCVg3a หรือ HCVg6f จริง ที่พร้อมในการทดสอบคุณสมบัติในการเป็น DNA vaccine ต่อไปด้วยการนำไปทดสอบการแสดงออกของยีน และทำ codon optimization เพื่อเพิ่มการแสดงออกของ ยีนตลอดจนนำไปทดสอบประสิทธิภาพการเป็นวัคซีนด้วยนำไปฉีดกระตุ้นในสัตว์ทดลองและวัดภูมิคุ้มกันทั้ง humoral และ cellular immune response หากการพัฒนาเป็นวัคซีนประสบความสำเร็จสามารถนำไปใช้ในการต่อต้านการติดเชื้อ HCV ได้

ผลผลิต (Output)

ผลงานวิจัยยังสามารถนำไปตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ อาทิ Journal of Medical Virology, Journal of Clinical Microbiology, Journal of General Virology และ Clinical and Molecular Hepatology เป็นต้นและ DNA vaccine ที่สร้างขึ้นสามารถนำจดสิทธิบัตรได้
หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์คือกระทรวงสาธารณสุข และผลิตได้ในเชิงพาณิชย์

เอกสารอ้างอิง

1. Alter, M.J., Hadler, S.C., Judson, F.N., Mares, A., Alexander, W.J., Hu, P.Y., Miller, J.K., Moyer, L.A., Fields, H.A. et. al. 1990. Risk factors for acute non-A, non-B hepatitis in the United States and association with hepatitis C virus infection. *JAMA* 264: 2231-2235.
2. Alter, A.J. 1994. Transmission of hepatitis C virus-route, dose, and titer. *N. Engl. J. Med.* 330: 784-786.
3. Alter H.J and Seeff, L.B. 2000. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin.Liver Dis.* 20: 17-35.
4. Antaki, N., Craxi, A., Kamal, S. et. al. 2010. The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6: An international consensus report. *Liver Int.* 30: 342-355.
5. Arashkia, A., Roohvand, F., Memarnejadian, A., Aghasadeghi, MR., Rafati, S. 2009. Construction of HCV-polytope vaccine candidates harboring immune-enhancer sequences and primary evaluation of their immunogenicity in BALB/c mice. *Virus genes* 40: 44-52.
6. Chao, D.T., Abe, K., Nguyen, M.H. 2011. Systemic review: epidemiology of hepatitis C genotype 6 and its management. *Aliment Pharmacol. Ther.* 34: 286-296.
7. Cooper, S., Erickson, A.L., Adams, E.J., Kansopon, J., Weiner, A.J., Chien, D.Y. et al., , 1999. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity.* 10: 439-449.
8. Degertekin, B. and Lok, A.S. 2007. Update on viral hepatitis. *Curr.Opin.Gastroenterol.* 24: 306-311.
9. Fried, M.W., Shiffman, M.L., Reddy, K.R. et.al. 2002. Peginterferon α -2b plus ribavirin for chronic hepatitis C infection. *New Eng. J. Med.* 347: 975-982.
10. Fung, J., Lai, C.L., Hung, I., et al., 2008. Chronic hepatitis C virus genotype 6 infection: response to pegylated interferon and ribavirin. *J. Infect. Dis.* 198: 808-812.
11. Jutavijittum P, Jiviriyawat Y, Yousukh A, Pantip C, Maneekarn N & Toriyama K. 2009. Genotypic distribution of hepatitis C virus in voluntary blood donors of northern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 40: 471-479.
12. Kanistanon D, Neelamek M, Dharakul T & Songsivilai S. 1997. Genotypic distribution of hepatitis C virus in different regions of Thailand. *J Clin Microbiol.* 35: 1772-1776.
13. Kao, J.H. and Chen, D.S. 2000. Transmission of hepatitis C virus in Asia: past and present perspectives. *J. GastroenterolHepatol* 15(Suppl): E91-E96.
14. Lao, W., Li, F.T., and Youde, P. 2001. Prevalence of genotype 6 chronic hepatitis C infection in Hong Kong. *Hepatology* 34: A689.
15. Lauer, G.M. and Walker, B.D. 2001. Hepatitis C virus infection. *N. Eng. J. Med.* 345: 41-52.

16. Lewin, A.A., Shinji, T., Khin, M., Win, N., Obika, M., Okada, S., Koide, N. 2007. Hepatitis C virus genotype distribution in Myanmar: predominance of genotype 6 and existence of new genotype 6 subtype. *Hepatol. Res.* 37: 337-345.
17. Lin, Y., Kwon, T., Polo, J., Zhu, Y.F., Coates, S., Crawford, K., Dong, C., Winingger, M., Hall, J., Selby, M., Coit, D., Medina-Selby, A., McCoin, C., Ng, P., DRrrrrane, D., Chien, D., Han, J., Vajdu, M., Houghton, M. 2008. Induction of broad CD4+ and CD8+ T cell response and cross-neutralizing antibodies against Hepatitis C virus by vaccination with Th1-adjuvanted polypeptides followed by defective alpha-viral particles expressing envelope glycoproteins gpE1 and gpE2 and nonstructural proteins 3,4 and 5. *J. Virol.* 82: 7492-7503
18. Lu, L., Nakano, T., He, Y., Fu, Y. Hagedon, C.H., Robertson, B.H. 2005. Hepatitis C virus genotype distribution in China: Predominance of closely related subtype 1b isolates and existence of new genotype 6 variants. *J. Med. Virol.* 75: 538-549.
19. Luksamijarulkul, P. & Plucktaweesak, S. 1996. High hepatitis C seroprevalence in Thai intravenous drug abusers and qualitative risk analysis. *Southeast Asian J. trop. Med. Public Health* 27: 654-658.
20. Manns, M.P., McHutchison, J.G., Gordon, S.C. et al. 2001. Peginterferon α -2b plus ribavirin compared with interferon α -2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. *Lancet.* 358: 958-965.
21. Masalovaa, O.V., Lesnovaa, E.I., Grabovetskii, V.V., Smirnovab, O.A., Ulanovac, T.I., Burkovc, A.N., Ivanob, A.V., Zaberezhnyi, A.D., Ataulakhanovd, R.I., Kushch, A.A. 2009. DNA immunization with a plasmid carrying the gene of hepatitis C virus PROTEIN 5A (NS5A) induces an effective cellular immune response. *Mol. Biol. (Mosk).* 44: 275-283
22. Mellor, J., Walsh, E.A. Prescott, L.E. et.al. 1996. Survey of type 6 group variants of hepatitis C virus in Southeast Asia by using a core-based genotyping assay. *J. Clin. Microbiol.* 34: 417-423.
23. Naamani, K.A., Sinani, S.A., and Deschenes, M. 2012. Review: Epidemiology and treatment of hepatitis genotypes 5 and 6. *Can. J. Gastroenterol.* 27: e8-e12.
24. Ndjomou, J., Pybus, O.G., and Matz, B. 2003. Phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates indicates a unique pattern of endemic infection in Cameroon. *J. Gen. Virol.* 84: 2333-2341.
25. Nguyen, M.H., Trinh, H., Garcia, R.T. at. al. 2004. High prevalence of novel genotypes in Vietnamese patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 126: 2020A.
26. Nguyen, M.H and Keeffe, E.B. 2005. Prevalence and treatment of hepatitis C virus genotype 4, 5 and 6. *Clin.GastroenteroHepatol.* 3 (Suppl): S95-S101.
27. Nguyen, M.H., Trinh, H.N., Garcia, R., Nguyen, G., Lam, K.D., Keeffe, E.B. 2008. Higher rate of sustained virologic response in chronic hepatitis C genotype 6 treated with 48

- weeks versus 24 weeks of peginterferon plus ribavirin. *Am. J. Gastroenterol* 103: 1131-1135.
28. Oh, H.B., Kim, S.O., Cha, C.H. et. al., 2008. Identification of hepatitis virus genotype 6 in Korean patients by analysis of 5' untranslated region using a matrix assisted laser desorption/ionization time of flight-based assay, restriction fragment mass polymorphism. *J. Med. Virol.* 80: 1712-1719.
 29. Pham, D.A., Leuangwutiwong, P., Jittimittraphap, A., Luplertlop, N., Bach, H.K., Akkarathamrongsin, S., Theamboonlers, A., and Poovorawan, Y. 2009. High Prevalence of Hepatitis C virus genotype 6 in Vietman. *Asian Pacific. J. Allergy Immunol.* 27: 153-160.
 30. Seong, M.H., Kil, H., Kim, J.Y., Lee, S. S., Jang, E. S., Kim, J-W., Jeong, S-H and et. al. 2013. Clinical and epidemiological characteristics of Korean patients with hepatitis C virus genotype 6. *Clin. Mol. Hepatology.* 19: 45-50.
 31. Seto, W.K. Lai, C.L., Fung, J., et. al., 2008. Interim analysis of the natural history of chronic hepatitis C genotype 1 and 6. *Hepatology.* 48: 1102A.
 32. Shinji, T., Kyaw, Y.Y., Gokan, K. et. al., 2004. Analysis of HCV genotypes from blood donors shows three new HCV type 6 subgroups exist in Myanmar. *Acta. Med. Okayama* 58: 135-142.
 33. Shoukry, N.H., Sidney, J., Sette, A., Walker, C.M. 2004. Conserved hierarchy of helper T cell responses in a chimpanzee during primary and secondary hepatitis C virus infections. *J. Immunol.* 172: 483-492.
 34. Simmonds P. 2004. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus-15 years on. *J. Gen. Virol.* 3173-3188.
 35. Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspe, G., Kuiken, C. et. al., 2005. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42: 962-973.
 36. Sugiyama, K., Kato, N., Nakazawa, T. et al. 1995. Novel genotypes of hepatitis C virus in Thailand. *J. Gen. Virol.* 76: 2323-2327.
 37. Sunanchaikarn S., Theamboonlers A., Chongsrisawat V., et al. 2007. Seroepidemiology and genotypes of hepatitis C virus in Thailand. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 25: 175-182.
 38. Tang, H. and Grise, H. 2009. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. *Clin. Sci.* 117: 49-65.
 39. Theamboonlers, A., Chinchai, T., Bedi, K., Jantaramee, P. Sripong, M., Poovorawan, Y. 2002. Molecular characterization of hepatitis C virus (HCV) core region in HCV-infected Thai blood donor. *ActaVirologica* 46: 169-173.

40. Tokita, H., Okamoto, H., Lizuka, H. et.al. 1996. Hepatitis C virus variants from Jakarta, Indonesia classifiable into novel genotypes in the second (2e and 2f), tenth (10e) and eleventh (11a) genetic groups. *J. Gen. virol.* 77: 293-301.
41. Ulla S., Muhammad, A.A.S., and Riaz, N. 2012. Recent advances in developemnet of DNA vaccines against Hepatitis C virus. *Indian J. Virol.* 23: 253-260
42. Wei, S.H., Yin, W., An, Q.X., Lei, Y.F., Hu, X.B., Yang, J., Lu, X., Zhang, H., Xu, Z.K. 2008. A novel hepatitis C virus vaccine approach using recombinant Bacillus Calmette-Guerin expressing multi-epitope antigen. *Arch. Virol* 153: 1021-1029.
43. World Health Organization. Hepatitis C. fact Sheet (October 2000).<http://www/who/int/dated 1/5/2005>