



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
การเปลี่ยนแปลงโคดอนเพื่อเพิ่มการแสดงออกของดีเอ็นเอวัคซีนต่อไวรัสตับอักเสบบีชนิดซีในเซลล์ที่มีต้น
กำเนิดมาจากคน

ชื่อหัวหน้าโครงการผู้รับทุน / ผู้วิจัย
รศ.ดร.อุไรวรรณ อินทมาโส
ดร.พลธิป ชูท่วม
ดร. กนกพร ศรีสุจริตพานิช
นายวิทยา ภูมิภักดิ์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2560A10802154

สัญญาเลขที่ 59/2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเปลี่ยนแปลงโคดอนเพื่อเพิ่มการแสดงออกของดีเอ็นเอวัคซีนต่อไวรัสตับอักเสบบีชนิดซีในเซลล์ที่มีต้น
กำเนิดมาจากคน

ชื่อหัวหน้าโครงการผู้รับทุน / ผู้วิจัย

รศ.ดร.อุไรวรรณ อินทมาโส

ดร.พลาธิป ชูท้วม

ดร. กนกพร ศรีสุจริตพานิช

นายวิทยา ภูมิภักดิ์

คณะสหเวชศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 59/2560

โครงการวิจัยนี้ได้สำเร็จลุล่วงด้วยดีเนื่องจากจากบุคคลหลายท่านที่ทุ่มเทในการทำงานวิจัยของนางสาวศิรินทิพย์ รัฐกิจ และผู้ร่วมทีมวิจัยทุกท่าน นอกจากนี้ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. กล่าวขวัญ ศรีสุข คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และ รศ.ดร. สันชัย พยุงพร คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ และอนุเคราะห์อุปกรณ์การวิจัย

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 59/2560).

This project was successful due to the dedication of Sirintip Ratthakit, and coworkers, Besides I am also be grateful to Associate professor Dr. Klaokwan Srisook Faculty of Sciences, Burapha University and Associate professor Dr. Sunchai Payungporn Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for valuable advice and experimental instrument.

บทคัดย่อ

โครงการการเปลี่ยนแปลงโคดอนเพื่อเพิ่มการแสดงออกของดีเอ็นเอวัคซีนต่อไวรัสตับอักเสบบชนิดซีในเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากคน

นางสาวอุไรวรรณ อินทมาโส^{1*}, นายวิทยา ภูมิภักดิ์², นายพลาธิป ชูท้วม¹

นางสาวกนกพร ศรีสุจริตพานิช¹, นางสาวศิรินทิพย์ รัฐกิจ¹

¹คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน ชลบุรี

²คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

* ผู้เขียนที่เป็นชื่อหลัก: uraiwani@buu.ac.th

ไวรัสตับอักเสบบชนิดซีที่ก่อให้เกิดการติดเชื้ออักเสบเรื้อรังที่ตับ และพัฒนาเป็นโรคมะเร็งตับยังคงเป็นปัญหาทางสาธารณสุข เพราะยังขาดวัคซีนและการรักษาที่มีประสิทธิภาพ จุดมุ่งหมายของการศึกษานี้คือสร้าง recombinant plasmids ที่สามารถแสดงออกได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีต้นกำเนิดมาจากมนุษย์ โดยเปรียบเทียบการแสดงออกของ NS3-NS4A gene จากสายพันธุ์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่กำหนดเป็น wild-type codon กับ โคดอนที่ผ่านการเปลี่ยนแปลงให้แสดงออกได้ดีในเซลล์เพาะเลี้ยง ของ NS3-NS4A gene จาก genotype g3a หรือ g6f เมื่อวิเคราะห์ HepG2 ที่ถูกนำเข้าสู่ด้วย recombinant plasmids ด้วยวิธี real-time PCR พบว่า wild-type codon ของ NS3-NS4A gene จาก genotype g3a หรือ g6f สามารถแสดงออกได้ดีกว่าโคดอนที่ผ่านการเปลี่ยนแปลงประมาณ 24-27 ล้านเท่า และ 3 ล้านเท่าตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบตัวควบคุม ภายใน HepG2 cell line ส่วนผลการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE polyacrylamide gel จากปฏิกิริยา in vitro transcription ควบคู่กับ translation ไม่สามารถตรวจสอบแถบโปรตีนเป้าหมายได้เนื่องจากมีโปรตีนที่ไม่จำเพาะอื่นเป็นจำนวนมาก ในทำนองเดียวกันวิธี western blot ที่ใช้ตรวจสอบโปรตีนเป้าหมายที่สร้างภายนอกหรือภายในเซลล์กลับพบแถบโปรตีนที่ไม่จำเพาะ อาจเนื่องมาจาก primary antibody ที่ใช้เป็นชนิด polyclonal antibody ที่วางจำหน่ายถูกกระตุ้นมาจากสายพันธุ์ที่พบระบาดทั่วไปจึงไม่จับจำเพาะต่อ genotype g3a หรือ g6f จากผลที่ได้แสดงไม่เป็นไปตามสมมุติฐานที่ว่า การเปลี่ยนแปลงโคดอนในเซลล์เพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงให้ผลการแสดงออกของยีนได้ดีกว่า wild-type อย่างไรก็ตาม recombinant DNA ที่สร้างได้จากสายพันธุ์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์จาก wild type ของ genotype g3a หรือ g6f น่าจะพัฒนาเป็น DNA vaccine ที่ต่อต้านการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบชนิดซีได้

คำสำคัญ

ไวรัสตับอักเสบบชนิดซี ดีเอ็นเอวัคซีน การเปลี่ยนแปลงโคดอน การแสดงออกของยีน

Codon optimization to enhance protein expression of a hepatitis C virus DNA vaccine in a human cell line

Uraiwani Intamaso^{1*}, Witthaya Poomipak², Palatip Chutoum¹, Kanokporn Srisucharitpanit¹,
Sirintip Ratthakit¹,

¹Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University, Bangsaen, Chonburi

²Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok

*Corresponding author: urawani@buu.ac.th

Hepatitis C virus that causes chronic liver infection and leads to liver cancer still remains one of major public health problems because of the lack of efficient vaccines and treatments. The aim of this study is to construct recombinant plasmids that can efficiently express in human cell lines and compare the expression of nucleotides encoding wild-type to optimized codons of HCVg3a or g6f NS3-NS4A gene. According to real-time PCR analysis of HepG2 transfected with recombinant plasmids, wild-type codons of genotype g3a or g6f can substantially express mRNA than optimized codons about 24-27 and 3 millions, respectively relative to the control, in HepG2 cell line. SDS-PAGE polyacrylamide gel analysis from in vitro transcription coupled with translation reaction cannot detect the target protein due to enormous non-specific protein background. Similarly, western blot analysis for the detection of in vitro and in vivo specific protein target unexpectedly detect non-specific proteins probably due to commercial polyclonal antibody raised from common genotypes thereby not binding to genotype g3a or g6f. These results were not agreed with the hypothesis of optimized codon always more efficiently express than wild-type codon. However, the constructed recombinant DNA from wild-type codons of genotype g3a or g6f could be developed for DNA vaccines against HCV infection.

Keywords:

Hepatitis C virus, DNA vaccine, codon optimization, gene expression

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)	หน้า
บทนำ	1
เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	2
วัตถุประสงค์	6
ขอบเขตการวิจัย	6
วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และ/หรือ แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
เนื้อเรื่อง	
วิธีดำเนินการวิจัย	7
การสร้าง recombinant plasmid	7
Ligation และ การคัดเลือก recombinant plasmid	9
การออกแบบ codon optimization	10
วิธี In vitro transcription และ translation	10
Transfection เข้า HepG2 cell lines	11
การวิเคราะห์การแสดงออกของ NS3 gene ด้วยวิธี dot blot และ Western blot	11
การวิเคราะห์การแสดงออกของ NS3 gene ด้วยวิธี qRT-PCR	12
ผลการวิจัย	14
การสร้าง DNA vaccine	14
การแสดงออกเป็นโปรตีน	22
การแสดงออกเป็น RNA	27
อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion)	37
สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นตอนต่อไป	39
ผลผลิต (Output)	40
เอกสารอ้างอิง (Reference)	41
ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด	47

สารบัญตาราง (List of tables)

หน้า

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่ใช้ในงานวิจัย

9

ตารางที่ 2 สรุป Relative gene expression ของยีนเป้าหมายเมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม

36

สารบัญญภาพ (List of illustrations)	หน้า
รูปที่ 1 แผนภาพของ pcDNA3.1- vector	7
รูปที่ 2 แผนผังการจับของ primer ที่บริเวณต่างๆ ใน NS3/4A region ของ HCV	8
รูปที่ 3 : การสร้างชิ้นส่วน DNA ที่ประกอบด้วย NS3-NS4A ชิ้นที่ 1 และ 2 ของ HCVg3a หรือ g6f ด้วยปฏิกิริยา PCR	15
รูปที่ 4 การสร้างชิ้นส่วน DNA ที่ประกอบด้วย NS3-NS4A ทั้งสายของ HCVg3a หรือ g6f ด้วยปฏิกิริยา assembly PCR	16
รูปที่ 5 plasmid ที่สกัดจาก transformants ของ HCVg6f	17
รูปที่ 6 Restriction enzyme analysis ของ HCVg6f transformants ด้วย BamHI-XbaI	18
รูปที่ 7 PCR analysis ของ HCVg6f transformants	19
รูปที่ 8 plasmid ที่สกัดจาก transformants ของ HCV g3a	20
รูปที่ 9 Restriction enzyme analysis ของ HCVg3a transformants ด้วย BamHI-XbaI	21
รูปที่ 10 PCR analysis ของ HCVg3a transformants	22
รูปที่ 11 SDS-PAGE จาก in Vitro transcription และ translation	24
รูปที่ 12 Western blot จาก in Vitro transcription และ translation	25
รูปที่ 13 dot blot analysis จาก HepG2 transfected cell	26
รูปที่ 14 Western blot analysis จาก HepG2 transfected cell	27
รูปที่ 15 การสร้าง cDNA ของ HepG2 cell line transfect ด้วย pcDNA3.1-/g3a หรือ g6f	29
รูปที่ 16 การเพิ่มจำนวน NS3-NS4A ด้วย real-time PCR ของ HepG2 ที่ transfection ด้วย pcDNA3.1-/HCVg3a	30
รูปที่ 17 การเพิ่มจำนวน NS3-NS4A ด้วย real-time PCR ของ HepG2 ที่ transfection ด้วย pcDNA3.1-/HCVg6f	31
รูปที่ 18 real-time PCR ของ HepG2 ที่ transfection ด้วย non-transfected cells (Mo)	32
รูปที่ 19 real-time PCR ของ HepG2 ที่ transfection ด้วย pcDNA3.1- vector control	33
รูปที่ 20 การเพิ่มจำนวน GAPDH endogenous control ด้วย real-time PCR ใน cell-transfected ด้วย HCVg3a หรือ g6f	34
รูปที่ 21 การเพิ่มจำนวน GAPDH endogenous control ด้วย real-time PCR ใน cell-transfected ด้วย pcDNA3.1-	35

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

Bacillus calmeteGurein	BCG
Genotype	g
Glycoprotein	gp
Hepatitis virus A	HAV
Hepatitis virus B	HBV
Hepatitis virus C	HCV
Hepatocellular carcinoma	HCC
Nonstructural proteins	NS
Open reading frame	ORF
Pegylated interferon	PEG-IFN
Sustained virological response	SVR
Untranslated region	UTR

บทนำ (Introduction)

เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน

RNA Genome ของ hepatitis virus C (HCV) มีความยาวประมาณ 9,600 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วยหนึ่ง open reading frame (ORF) โดยมี untranslated region (UTR) อยู่ทางปลาย 3' และ 5' เมื่อ ORF ถูกถอดรหัสเริ่มต้นจะได้ polypeptide สายยาวที่มีความยาวประมาณ 3,000 amino acids ต่อมาจะถูกตัดด้วย protease ได้โปรตีนชนิดต่างๆ ได้แก่ 3 structural proteins (core, E1 และ E2) และ 7 nonstructural proteins (NS) (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A และ NS5B) (Tang and Grise, 2009) การแบ่ง HCV ออกเป็น genotype (g) ต่างๆ ตามเกณฑ์มาตรฐานสากลได้กำหนดให้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ 5' UTR ซึ่งเป็นบริเวณ conserved region เป็นเกณฑ์ในการแบ่ง ถ้าบริเวณดังกล่าวมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันประมาณ 31-33% HCV จะถูกแบ่งออกเป็น genotypes ต่างกัน ด้วยหลักเกณฑ์ดังกล่าวทำให้สามารถแบ่ง HCV ออกได้เป็น 6 genotypes และในแต่ละ genotype ยังสามารถแบ่งย่อยออกเป็น subtype ต่างๆได้อีก โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ core gene ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการอนุรักษ์เช่นกัน (แต่มีความหลากหลายมากกว่า 5' UTR) ถ้ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันประมาณ 20-25% (Simmonds et al., 1994, 2005) การทราบข้อมูล genotype ของ HCV ต่างๆ มีความสำคัญมากเพราะทำให้ทราบถึงรูปแบบการกระจายของไวรัสไปยังภูมิภาคต่างๆ (geographic distribution) วิธีการแพร่ระบาด (mode of transmission) และผลการตอบสนองต่อการรักษาด้วย pegylated interferon (PEG-IFN) และ ribavirin เป็นต้น

HCV g1, 2 และ 3 มีการกระจายอยู่ทั่วโลกและเป็นสาเหตุส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในผู้ป่วย โดยพบว่า subtype 1a และ 1b มีการระบาดมากที่สุดในทวีปยุโรป 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 Keeffe, 2005)

การติดเชื้อด้วย HCV เกิดขึ้นผ่านทางเลือด ในประเทศในกลุ่มที่พัฒนาแล้วมักมีการติดเชื้อผ่านทาง การฉีดสารเสพติด แต่ประเทศกำลังพัฒนาที่มีการติดต่อจากการฉีดสารเสพติดเช่นกันโดยเฉพาะประเทศไทยที่มีการติดต่อจากการฉีดสารเสพติดประมาณ 95% (Luksamijarulkul & Plucktaweesak, 1996) นอกจากนี้ยังมีการได้รับเชื้อผ่านการได้รับเลือด การฉีดวัคซีน การสักหรือการเจาะผิวหนัง การทำ hemodialysis รวมทั้งผ่านทางเพศสัมพันธ์ด้วย (Alter, 1994; Alter et.al., 1990) โดยวิธีการแพร่ระบาดมีความเกี่ยวข้องกับการกระจายของ genotype จากการศึกษาพบว่า HCV subtype 1a อาจมีการแพร่กระจายผ่านการให้เลือดและการปฏิบัติทาง

การแพทย์ที่ไม่ปลอดภัย subtype 1a และ 3a มีการระบาดมากในคนที่มีอายุน้อยโดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้เสพยาที่
ใช้เข็มฉีดยา (injecting drug users หรือ IDUs) ในประเทศอเมริกา สหรัฐอาณานิคม อุเบกิส-ฐาน รัสเซีย และ
ประเทศไทย (Simmonds, 2004) และ genotype 4 และ 6 มีการติดต่อผ่านทาง การเจาะหรือสักผิวหนัง ใน
ประเทศที่กำลังพัฒนา (Kao, and Chen, 2000)

จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีรายงานว่าในประเทศไทยมีการระบาดของ HCV genotype 3a มากที่สุด
ประมาณ 39-51% ในทุกพื้นที่ในประชากรทั่วไปและยังพบระบาดมากในผู้เสพยาเสพติดประมาณ 75-83% ของ
การติดเชื้อ HCV ส่วนอันดับรองลงมาคือ genotype 1 เช่น 1a, 1b และ 2a และ 6 (Theamboonlers, et. al.,
2002; Kanistanon et. al., 1997) แต่ genotype 2 พบได้น้อยมาก และเป็น genotype ที่พบน้อยในทวีปเอเชีย
ตะวันออกเฉียงใต้ ข้อมูลการระบาดของ genotype 2 ส่วนใหญ่จึงมาจากประเทศญี่ปุ่น เกาหลีใต้ จีนทางตอนเหนือ
และยุโรป อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าพบการระบาดของ genotype 2 ที่จังหวัดเชียงรายซึ่งตั้งอยู่ใกล้ชายแดนไทย-
เมียนมาจึงอาจเป็นไปได้ว่า genotype 2 มีการแพร่ระบาดจากคนเมียนมาที่เดินทางข้ามชายแดนมายังฝั่งไทย ซึ่ง
สอดคล้องกับรายงานของ Lewin และคณะ (Lewin et. al., 2007) ที่พบ genotype 2 ในประเทศเมียนมา สำหรับ
ประเทศเพื่อนบ้านของเรา อาทิ เมียนมา ลาวและเขมร 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) สำหรับ HCV
genotype 6 มีทั้งหมด 21 subtypes ที่มีการตั้งชื่อตั้งแต่อักษร a ถึง u (Naamani et al., 2012) โดย subtype
6a พบระบาดในทิศตะวันตกเฉียงเหนือของทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ที่รวมถึงประเทศไทย (Sunanchaikarn,
et. al. 2007; Shinji, et. al., 2004) และประเทศจีนทางตอนใต้เขตติดชายแดนเวียดนาม (Lu, et. al., 2005;
Degertekin and Lok, 2007) และพบมากในประเทศเวียดนาม ด้วยวิธีการแพร่ระบาดของ genotype 6 ที่
เกี่ยวข้องกับการใช้ฉีดยาเสพติดด้วยเข็มฉีดยาและผ่านการมีเพศสัมพันธ์ (Antaki et. al., 2010) สำหรับการ
ระบาดของ 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) ซึ่งมีความชุกคล้ายกับที่พบในประเทศไทย ข้อมูลการ
ระบาดของ genotype 6 มีการรายงานไว้น้อยมาก ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากการเก็บตัวอย่างอาจไม่สมบูรณ์หรือ
low prevalence ของประชาชนในท้องถิ่นนั้นที่มีการสัมผัสเชื้อมายาวนานทำให้มีภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ HCV ในระดับ
ที่สูงมากจึงตรวจไม่พบเชื้อไวรัส นอกจากนี้หลายงานวิจัยได้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ 5'UTR แต่เพียงอย่าง
เดียวในการจำแนกสายพันธุ์อาจทำให้พลาดในการตรวจพบ genotype 6 ได้ เพราะอาจมีการรายงานการตรวจพบ
เป็น genotype 1 เนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกันที่บริเวณนี้ ปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับ genotype 6 จึงมีน้อย

มากทั้งเรื่องปัจจัยเสี่ยงและอาการทางคลินิก แต่มีการศึกษาหนึ่งได้รายงานว่าไม่มีความแตกต่างกันทางด้าน liver biochemistry, titers, cirrhosis และ ความเสี่ยงในการเกิด HCC ระหว่าง genotype 1 และ 6 (Seto et al., 2008) นอกจากนี้ยังได้มีการรายงานว่าผู้ป่วยที่ติดเชื้อ genotype 6 มีอาการที่ปรากฏออกมาน้อยและมีการตอบสนองดีต่อการรักษาด้วย interferon โดยมีค่า sustained virological response (SVR) (ค่าของ viral RNA ที่หายไปจากซีรัมซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงประสิทธิภาพของการรักษา) ประมาณ 60-80% (Nguyen et al., 2008; Fung et al., 2008; Seong et al., 2013) อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถชี้ชัดได้ว่า genotype 6 มีความสามารถในการก่อให้เกิดพยาธิสภาพได้น้อย แต่อาจเป็นเพราะ genotype 6 ก่อให้เกิด atypical hepatitis ที่ยากต่อการตรวจพบก็เป็นได้

DNA vaccines เพื่อต่อต้านเชื้อ HCV ได้ถูกพัฒนาออกมาในหลายรูปแบบ Lin et al. (Lin et al., 2008) โดยมีการสร้าง alphaviral particle ที่สามารถ express glycoprotein (gp) E1, gpE2, NS3, NS4 และ NS5 ที่สามารถกระตุ้น cross reacting antibodies และสามารถต่อต้าน HCV ได้ใน BALB/c mice แต่มีปัญหาที่ไม่สามารถต่อต้าน HCV ได้ใน human host cells และต้องมีการฉีดซ้ำหลายๆครั้ง ต่อมาได้มีการพัฒนา DNA vaccine ให้มีประสิทธิภาพในการต่อต้าน HCV ได้ดีขึ้นและจำเพาะมากขึ้น 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) ให้ผลกระตุ้น T cell response ได้สูงขึ้นและต่อต้าน HCV ได้ในหนูทดลอง นอกจากนี้ได้มีการนำ Bacillus calmetteGurein (BCG) มาใช้เป็น vector ร่วมกับ pDE22-CtEm และ pDE22-CS1 ด้วยการแทรกชิ้นส่วนของ Core, E2 และ CTL epitopes เข้าไป เพื่อพัฒนาเป็น DNA vaccine ต่อ HCV ที่สามารถกระตุ้น cellular immunity ได้อย่างจำเพาะในหนู แต่สามารถกระตุ้น humoral immune response ได้ดีต่อ rBCG-CtEm เท่านั้น (Wei et al., 2008) ในทำนองคล้ายกัน ได้ผู้นำมาใช้พัฒนา DNA vaccine โดยใช้ non-structural gene (NS) เช่น NS5a ที่สามารถเพิ่มการกระตุ้น T cell response ได้เมื่อใช้ผสมกับ adjuvant (Masalovaa et al., 2009) ส่วน NS3 สามารถกระตุ้น T cell response ต่อ HCV ในผู้ติดเชื้อแบบฉับพลันและแบบเรื้อรังได้ (Cooper, et al., 1999) และสามารถเหนี่ยวนำการตอบสนองได้ทั้ง Class I และ classII restricted T cell response (Shoukry et al., 2004) ดังนั้นจึงได้รับการสนใจว่า NS3 อาจนำมาพัฒนาเป็นวัคซีนได้ เนื่องจากมีความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variability) ต่ำ ทำหน้าที่เป็น enzyme และเป็นโปรตีนที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่ (Bartenschlager et al. 1993; Bartenschlager et al. 1995; Failla et al., 1994; Pang et al., 2002) และเมื่อใช้ NS3-4A protease สามารถกระตุ้น humoral immune response ได้มีประสิทธิภาพมาก (Lazdina et al., 2001) เพราะการปรากฏ

ของ NS4A cofactor สามารถเพิ่ม intracellular stability ของ NS3 และยังเพิ่มการแสดงออกของ NS3 ซึ่งมีผลในการเพิ่ม immunogenicity ของ NS3 ด้วย (Tanji et al., 1995)

วิธีหนึ่งในการเพิ่ม immunogenicity ของ NS3 สามารถทำได้ด้วยการเปลี่ยนแปลงรหัสที่กำหนดการสร้าง amino acid (codon) ให้สามารถแสดงออกของยีนภายใน mammalian cells ได้ดีขึ้น (codon optimization) ได้มีรายงานว่า optimized codon ของ NS5A แม้เพียงตำแหน่งเดียวสามารถเหนี่ยวนำให้เกิด polyfunctional NS5A-specific CD8⁺ T cell responses ซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญของ NS5A-expressing tumor cells เมื่อทดสอบ *in vivo* ได้ (Holmstrom et al., 2013) และ codon optimization ของ human papillomavirus E7 oncogene สามารถเหนี่ยวนำ CD8⁺ T cell response ได้ทั้งนี้เพราะเกิด artificial immunogenicity ของ transgene ผ่าน dominant cryptic epitope (Lorenz et al., 2015) และสามารถปกป้องการติดเชื้อได้ (Demi, et al., 2001; Wang, et al., 2011; Fooladi et al., 2014)

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การติดเชื้อ 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) แต่เชื้อไวรัสยังคงแฝงอยู่ในร่างกายและมีการพัฒนาของโรคไปอย่างช้าๆจนกลายเป็นโรคตับเรื้อรัง และรุนแรงขึ้นจนเกิดอาการตับแข็ง (cirrhosis) และ มะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma หรือ HCC) ในที่สุด โดยการติดเชื้อ HCV จะแตกต่างกับการติดเชื้อด้วย hepatitis virus A (HAV) และ B (HBV) ที่เป็นการติดเชื้อแบบฉับพลันและมีโอกาสเกิดโรคตับแข็งและมะเร็งตับได้น้อยกว่า

HCV อยู่ในตระกูล *flaviviridae* และ genus *hepacivirus* มี genome เป็น RNA สายเดี่ยวเส้นบวก มีความยาวประมาณ 9,600 นิวคลีโอไทด์ เนื่องจากเป็น RNA virus จึงมีการกลายพันธุ์ บน 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 ยังสามารถแฝงอยู่ในร่างกายจนก่อให้เกิดโรคเรื้อรัง (Alter and Seeff, 2000) รวมทั้งสามารถหลบเลี่ยงการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันได้ด้วย จากคุณสมบัติของ HCV ที่กล่าวมาทั้งหมดนี้จึงเป็นปัจจัยทำให้ไม่สามารถผลิตวัคซีนหรือยาที่มีประสิทธิภาพในป้องกันหรือรักษา HCV ได้ในปัจจุบัน

ปัจจุบันการรักษาผู้ติดเชื้อ HCV ใช้วิธีการให้ PEG-IFN ร่วมกับ ribavirin ที่เป็น nucleotide analog แต่การรักษาที่ต้องใช้ระยะเวลาประมาณ 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 SVR ได้ประมาณ 80-90% แต่เมื่อใช้กับ genotype 1 ซึ่งเป็น genotype ที่พบมากถึง 70% กลับมีผลเพียงแค่ 40-50% เท่านั้น (Manns et al., 2001; Fried et al., 2002)

การสร้างวัคซีนเพื่อใช้ป้องกัน HCV นับว่าเป็นงานท้าทายมาก ปัจจุบันการสร้างวัคซีนแบบทั่วไป (conventional vaccines) ซึ่งต้องใช้ไวรัสที่ active อยู่เป็นตัวตั้งต้นยังให้ผลของการตอบสนองน้อยมาก (Ulla et al., 2012) การป้องกันและควบคุม HCV ด้วยวิธีการสร้าง DNA วัคซีนน่าจะได้ผลดีกว่าวัคซีนชนิดอื่นๆ เพราะสามารถกระตุ้นการสร้างได้ทั้ง Humoral Immune response และ Cell Mediated Immune response และมีข้อดีที่สามารถออกแบบได้ตามต้องการ โดยสามารถออกแบบให้ต่อต้านไวรัสที่มีหลาย genotypes และ หลายสายพันธุ์ได้ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมและยังสามารถเพิ่มปริมาณได้มากด้วย นอกจากนี้ยังมีความปลอดภัยมากเมื่อเปรียบเทียบกับวัคซีนชนิด attenuated หรือ inactivated vaccines อย่างไรก็ตาม DNA vaccines มีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ต่ำ (low immunogenicity) โดยทั่วไปให้ผลการทดสอบในสัตว์ทดลองแตกต่างกับการทดสอบในคน (Spearman et al., 2009; Kutzler et al., 2004) ดังนั้นนักวิจัยจึงมีความพยายามในการเพิ่ม immunogenicity ของ DNA vaccines ด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ การคิดค้นวิธี นำเข้าสู่ภายในเซลล์, การใช้ molecular adjuvants ชนิดต่างๆ และ codon optimization เป็นต้น

โครงการวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายในการนำ recombinant plasmid ที่มีส่วน DNA insert sequence ที่ประกอบด้วย NS3 และ NS4A จาก HCV genotype 3 หรือ 6 ที่พบว่ามี ความชุกของการแพร่ระบาดมาจากโครงการวิจัยก่อนหน้านี้ ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนภายใน human cell line และเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ wild type กับ optimized codon หาก recombinant plasmid มีการแสดงออกของยีนได้ดีแล้วน่าจะสามารถใช้เป็น DNA vaccine ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อ HCV ได้

วัตถุประสงค์

1. สร้าง recombinant plasmid โดยใช้ pcDNA3.1⁻ vector ที่ประกอบด้วย NS3-4A gene ของ HCV g3a หรือ 6f
2. เปรียบเทียบการแสดงออกของ NS3-4A gene ระหว่าง wild type NS3-4A gene และ optimized codon ทั้ง in vitro และ in vivo

ขอบเขตการวิจัย

ชิ้นส่วน DNA ที่ประกอบด้วย non-structural 3-4A (NS3-4A) gene ของ HCV g3a หรือ 6f ที่มีความยาวประมาณ 2.1 k ภายใน pVAX1 ที่สร้างจากโครงการวิจัยก่อนหน้านี้ได้ถูกเพิ่มขยายจำนวนด้วยวิธี assembly PCR แล้วนำมา insert เข้าไปภายใน pcDNA3.1⁻ vector ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทราบจากการวิเคราะห์ด้วย DNA sequencing ของ wild-type virus ได้นำมาเปลี่ยนแปลงให้เป็น codon ที่สามารถแสดงออกได้ดีใน mammalian cells จากนั้นนำ recombinant plasmid ที่มีชิ้นส่วน NS3-4A gene ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ wild type หรือ optimized codon ไปศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนภายนอกเซลล์ด้วยวิธี *in vitro* transcription และ translation หลังจาก transfection เข้าสู่ภายใน Hep2G cell line ซึ่งมีต้นกำเนิดมาจาก liver human cell แล้วนำมาทดสอบภายในเซลล์ด้วยวิธี qRT-PCR , dot blot และ western blot

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และ/หรือ แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

HCV เป็น RNA virus ที่มีอัตราการกลายพันธุ์สูง มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความผันแปรจึงทำให้ถูกแบ่งย่อยออกเป็น genotype และ subtype ต่างๆ การพัฒนา DNA vaccine ให้มีประสิทธิภาพในการต่อต้านการติดเชื้อได้จำเป็นต้องมีการแสดงออกของยีนได้ดี และสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่มีความจำเพาะต่อ genotype และ subtype โดยเฉพาะกลุ่มที่มีความชุกของการระบาดสูงในพื้นที่ การเปลี่ยนแปลงชนิดของ codon ให้เหมาะสมกับประเภทของโฮสต์เซลล์น่าจะเป็นส่งเสริมให้ยีนมีการแสดงออกได้ดีขึ้นและน่าจะเป็นการเพิ่ม immunogenicity เมื่อใช้เป็น DNA vaccine ได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

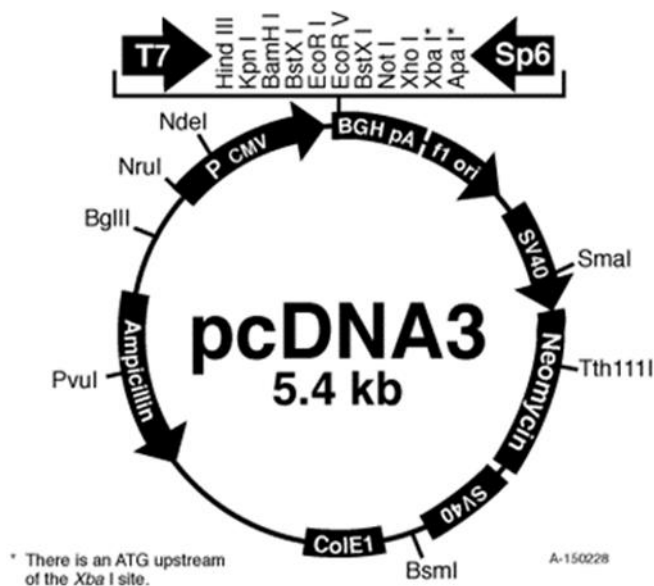
ผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ทางด้านวิชาการโดยข้อมูลที่ได้จะทำให้ทราบถึงผลของการเปลี่ยนแปลง codon ของ wild type DNA insert ที่มีต่อการแสดงออกของยีนภายใน mammalian cells และนำมาใช้ประโยชน์ในการสร้าง DNA vaccine ที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ผลงานวิจัยยังสามารถนำไปตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ อาทิ Journal of Medical Virology, Journal of Clinical Microbiology, Journal of General Virology, Gene therapy และ Clinical and Molecular Hepatology เป็นต้นและ DNA vaccine ที่สร้างขึ้นสามารถนำจดอนุสิทธิบัตรได้
หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์คือกระทรวงสาธารณสุข

รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย

การสร้าง recombinant plasmid

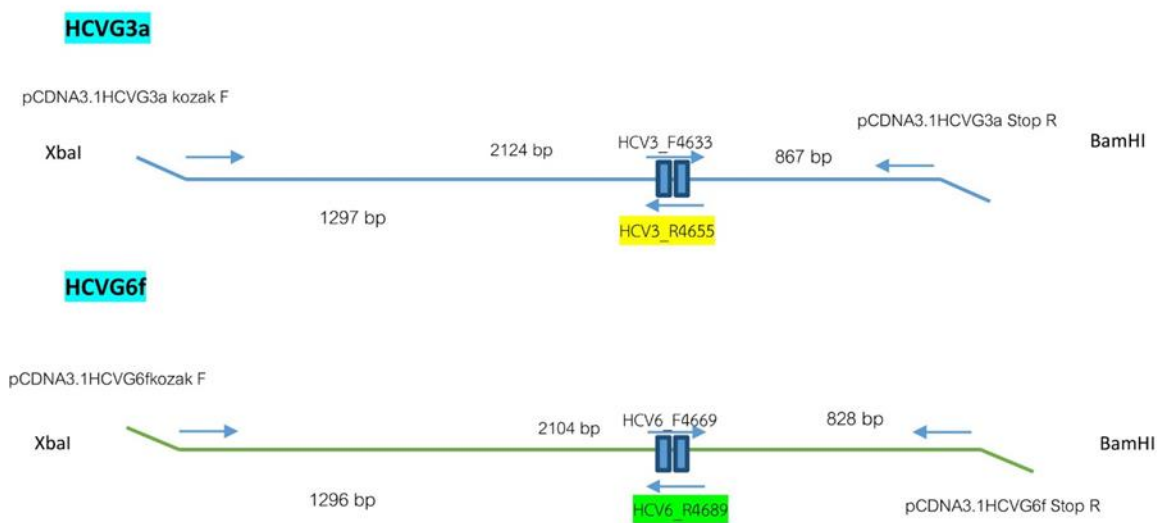
ชิ้นส่วน NS3-4A region ได้ถูกเพิ่มขยายจำนวน ด้วย one-step RT-PCR โดย primer ได้ถูกออกแบบให้มีส่วนปลาย 5' และ 3' ที่ประกอบด้วย restriction site ของ *Bam*HI และ *Xba*I ตามลำดับ เพื่อประโยชน์ในการ cloning เข้าไปภายใน pcDNA3.1⁻ vector (รูปที่ 1) นอกจากนี้ forward primer ยังมีส่วนของ Kozak sequence และ ATG ที่ใช้ในการแสดงออกของยีน และส่วน reverse primer ประกอบด้วย stop codon (รูปที่ 2)



รูปที่ 1 แผนภาพของ pcDNA3.1- vector

เนื่องจาก NS3-NS4A ของ HCV มีขนาดความยาวประมาณ 2.1 kb การสร้าง recombinant plasmid ใช้ปฏิกิริยา one-step RT-PCR ที่สามารถเพิ่มขยายจำนวนได้ชิ้นส่วนของ cDNA ที่ละชิ้น โดยส่วนปลาย 3' ของชิ้น

ที่ 1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีส่วน complementary กับส่วน 5' ของ cDNA ชั้นที่สอง จากนั้นนำชิ้นส่วนที่ได้ทั้งคู่กันมา assembly กันแล้วทำปฏิกิริยา PCR ในรอบสุดท้ายด้วยคู่ primer ที่จับที่ปลายสุดทาง 5' และ 3' ของ NS3-NS4A gene หลังจากเพิ่มขยายจำนวนแล้วจะได้ชิ้นส่วนของ NS3-NS4A DNA ที่ยาวครบทั้งสาย สำหรับการเพิ่มขยาย NS3-NS4A gene ของ HCV g3a นั้น cDNA ชั้นที่ 1 ใช้ forward primer ที่มีส่วนที่จับจำเพาะที่ปลาย 5' ของ NS3 gene แต่มีส่วนที่เพิ่มมาเป็น Kozak sequence ที่ช่วยในการแสดงออกของ gene และ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pcDNA3.1⁻ ที่ใช้ใน in fusion ligation (In-Fusion cloning kit ; Clontech) และ HCV R 4655 ซึ่งเป็น reverse primer หลังจากการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของยีนแล้วจะได้ผลผลิต cDNA ขนาดประมาณ 1,297 bp ส่วน cDNA ชั้นที่สองมีขนาดประมาณ 867 bp ได้จากการเพิ่มขยายยีนโดยใช้คู่ของ primer F4633 และ reverse primer ที่ประกอบด้วย stop sequence ตามด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pcDNA3.1⁻ ที่ใช้ใน in fusion ligation และในทำนองเดียวกันการขยายเพิ่มจำนวนของ HCV g6f ใช้คู่ของ primer คู่แรก คือ pcDNA3.1⁻ HCVg6f Kozak F และ HCV R4689 ส่วนคู่ที่สองคือ HCV F4669 และ pcDNA3.1⁻ HCVg6f Stop R (ตารางที่ 1)



รูปที่ 2 แผนผังการจับของ primer ที่บริเวณต่างๆ ใน NS3/4A region ของ HCV

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ที่ใช้ในงานวิจัย

name	sequences	Tm	Binding sites (nt)	Expected band	Total Expected band
pcDNA3.1 HCVg3a Kozak F	5'-CGTTTAAACGGGCCCTCTAGAATGAGGCCGTGAGGTGT -3'	83.3	3376	1279 bp	2124 bp (NS3-NS4A) G3a
HCV R4655	5'-ACGACGTCTCCTGTTGTTGGTAT-3'	65.6	4655		
HCV F4633	5'-ATACCAACAACAGGAGACGTCGT-3'	65.6	4633		
pcDNA3.1 HCVg3a Stop R	5'-CTTGGTACCGAGCTCGGATCCCAGCTTGTGAGCACT -3'	83.6	5500	867 bp	
pcDNA3.1 HCVg6f Kozak F	5'-CGTTTAAACGGGCCCTCTAGAATGAAGAGCAAGGGCTG -3'	81.7	3393	1269 bp	2104 bp (NS3-NS4A) G6f
HCV R4689	5'-GTAGCCGGTCATAAGGGCGTC-3'	68.6	4689		
HCV F4669	5'-GACGCCCTTATGACCGGCTAC-3'	68.6	4669		
pcDNA3.1 HCVg6f Stop R	5'-CTTGGTACCGAGCTCGGATCCGCTTAGAGCACTCCT-3'	82	5497	828 bp	
G3aRT_F	5'-TATTGCCTGCCTCAAAGG-3'	53.9	3828	131 bp	คู่กับ R3959
G6fRT_F	5'-ACTTAGAGGTCATCACCAGCACC-3'	64.7	5307	190 bp	คู่กับ pCDNA3.1 HCVg6f Stop R

Ligation และ การคัดเลือก recombinant plasmid

DNA insert ที่ประกอบด้วย NS3-NS4A ของ HCVg3a หรือ HCV g6f ที่มีขนาดประมาณ 2.1 kb ได้ถูกนำไป insert เข้าไปภายใน *Bam*HI และ *Xba*I linearized pcDNA3.1 ด้วย homologous recombination ระหว่างปฏิกิริยา PCR โดยใช้ชุดทดสอบ In-Fusion cloning kit (Clontech) ซึ่งได้กำหนดให้ต้องออกแบบ primer ที่นอกจากจับจำเพาะที่ปลายทั้งสองข้างของ NS3/4A region แล้วยังมีส่วนเกินที่จับปลายทั้งสองข้างของ *Bam*HI และ *Xba*I linearized pcDNA3.1- ประมาณ 15 bp ด้วยเพื่อใช้ใน homologous recombination โดยใช้อัตราส่วน (mass) ของ insert DNA ต่อ vector เท่ากับ 2:1 หรือประมาณ 100 ng: 50 ng ตามวิธีที่แนะนำมา กับชุดทดสอบ จากนั้นนำผลผลิตที่ได้ไป transform เข้า JM109 competent cells ด้วยวิธี heat shock แล้วคัดเลือก

recombinant colonies ที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LA ที่มี 50 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin สกัด plasmid จาก transformants มาพิสูจน์ความถูกต้องของชิ้น DNA insert โดยการตรวจคัดกรองขั้นแรกใช้วิธีการวิเคราะห์บน 0.8% agarose gel electrophoresis หากเป็น recombinant plasmid จะสังเกตการเคลื่อนที่ของแถบ DNA ซ้ำกว่า pCDNA3.1- vector หลังจากนั้นนำมาพิสูจน์ต่อด้วยการตัดด้วย *Bam*HI และ *Xba*I digestion และ PCR นอกจากนี้ยังยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย DNA sequencing ที่เป็นวิธีมาตรฐานด้วย

การออกแบบ codon optimization

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ wild type NS3/4A ของ HCV genotype 3a หรือ 6f ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบการระบาดมีอัตราสูงจากงานวิจัยที่ผ่านมาได้ถูกนำมาเปลี่ยนแปลงให้เป็นชนิดของ codon ที่ใช้มากที่สุด ใน human cells (Gene Universal, Inc) แล้วนำผลจากการวิเคราะห์มาสร้างสาย synthetic nucleotide และปลายสาย 5' และ 3' มี restriction site เป็น *Bam*HI และ *Xba*I เพื่อใช้ใน cloning ภายใน pcDNA3.1- vector (Invitrogen, USA) หลังจากตัดด้วย enzyme ดังกล่าว แล้วนำ DNA constructs ไป ligation แล้ว นำส่วนผสมไป transform เข้าไปใน *E. coli* สายพันธุ์ JM109 เพื่อเจริญเพิ่มจำนวนแล้วนำไปวิเคราะห์หาลำดับ นิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ ต่อไป

วิธี In vitro transcription และ translation

Recombinant plasmids ที่ประกอบด้วย HCV genotype 3a หรือ 6f ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ แบบ wide-type genotype ละ 2 ตัวอย่างและที่ผ่านการทำ codon optimization มา genotype ละ 1 ตัวอย่าง และ pcDNA3.1- vector รวมทั้งสิ้น 7 ตัวอย่างจะถูกนำมาทดสอบการแสดงออกของยีน โดยทำปฏิกิริยาควมรวมระหว่าง transcription และ translation ได้ผลผลิตโปรตีนภายในหลอดทดลอง โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย 1 μg Recombinant plasmids และ TNT@T7 master mix, methionine ตามที่ระบุในชุดทดสอบ ในปริมาตรทั้งหมด 50 μl หลังจากนั้นนำส่วนผสมไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 60-90 นาที แล้วนำไปวิเคราะห์ผลผลิตโปรตีนที่ได้ด้วย SDS-PAGE ย้อมสีด้วย Commassie brilliant blue และวิเคราะห์ด้วย western blot โดยใช้ rabbit anti-HCV NS3 polyclonal antibody (ab250686, Abbotect) ดังวิธีการที่จะกล่าวโดยละเอียดต่อไป

Transfection เข้า HepG2 cell lines

HEPG2 cell line จำนวน 1.3×10^5 cells / 1 ml ใน 1XDMEM low glucose serum-free medium ที่มี 1X penicillin- streptomycin, 0.55 $\mu\text{g/ml}$ fungizone และ 0.01 M HEPES, pH 6.8 ได้ถูกเพาะเลี้ยงลงใน 24 well-culture plate นำเซลล์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C , 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วันถัดมาเตรียมปฏิกิริยา transfection โดยใช้ 1 μg plasmid ใน 100 μl serum-free medium โดย plasmid ประกอบด้วย HCV genotype 3a หรือ 6f ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ แบบ wide-type genotype ละ 2 ตัวอย่างและที่ผ่านการทำ codon optimization มา genotype ละ 1 ตัวอย่างโดยมี pcDNA3.1- หรือ mock cell ที่มีเพียงอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็น negative control เติม 2 μl Turbofect transfection reagent (Thermo scientific) ลงไปผสมเบาๆ ให้เข้ากับ plasmid ด้วย vortexing แล้วนำส่วนผสมไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15-20 นาที เมื่อครบเวลาให้ถ่ายโอน DNA lipid complex ที่ได้จากปฏิกิริยา ลงไปในแต่ละหลุมของ culture plate ที่ label ว่าวันที่ 1,2 หรือ 3 ตามลำดับ โดยทันทีที่เติมส่วนผสมลงไปรีบ mix กระจายให้ทั่วแล้วนำไปบ่มในตู้ 5% CO_2 incubator ที่อุณหภูมิ 37°C หลัง transfection เป็นเวลา 24, 48 หรือ 72 ชั่วโมง ทำการล้างเซลล์ในหลุมด้วย 200 μl 1X PBS และเติม 200 μl trypsin บ่มที่อุณหภูมิเป็นเวลา 2-3 นาที เพื่อเซลล์ให้หลุดจากกันหลุม แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 200 μl serum-free medium จากนั้นดูดเซลล์เพื่อนำไปปั่นเพื่อเก็บ cell pellet นำไปสกัดโปรตีนด้วย 50 μl RIPA buffer (Thermo Scientific) ที่เติม Halt protease inhibitor cocktail (Thermo Scientific) 10 $\mu\text{l/ml}$ ให้มีความเข้มข้นเป็น 1 เท่า และนำไปวัดความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้ด้วยชุดสกัดด้วย Pierce™ BCA protein assay kit (Thermo Scientific) ก่อนนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในขั้นตอนต่อไป

การวิเคราะห์การแสดงออกของ NS3 gene ด้วยวิธี dot blot และ Western blot

โปรตีนที่แสดงออกภายใน HepG2 cell lines ได้ถูกนำมาวิเคราะห์การแสดงออกของยีนตามวันที่กำหนด ด้วยวิธี dot blot และวิเคราะห์หาความจำเพาะด้วย western blot สำหรับการวิเคราะห์ด้วย dot blot ให้หยุดโปรตีน 20 ng ลงบนแผ่น nitrocellulose membrane จากนั้นนำแผ่น membrane ไปอบใน oven ที่อุณหภูมิ 80°C ตลอดคืน แล้วนำมาบ่มด้วย rabbit anti-HCV NS3 polyclonal antibody (ab250686, Abbiotect) ที่อุณหภูมิห้องโดยเขย่าตลอดเวลา เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม Optimized HRP reagent working dilution (Pierce Fast Western Blot Kit, Super Signal West Pico Substrate, Rabbit (Thermo Scientific) บ่มที่อุณหภูมิห้องพร้อมเขย่าตลอดเวลาเบาๆ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างแผ่น membrane ด้วย 1x wash buffer ด้วยการเขย่าตลอดเวลา เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง เติม KPL 1-Component TMB Membrane Peroxidase Substrate (seracare) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาทีแล้วสังเกตจุดสีที่เกิดขึ้นแล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการจุ่มในน้ำสะอาดประมาณ 20-30 วินาที สำหรับการทดสอบด้วยวิธี western blot ทำการแยกโปรตีนปริมาณ 50 ng

ด้วย SDS-PAGE ที่ประกอบด้วย 5% stacking gel 10% separating gel กระแสไฟ 25 mA 60 volt 30 นาที และ 60 mA 120 Volt 2 ชั่วโมง จากนั้นขนถ่ายโปรตีนไปยัง nitrocellulose membrane ด้วย กระแสไฟ 36 mA 300 volt เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นอบแผ่น membrane ตามด้วยสภาวะที่ใช้ทดสอบด้วยวิธี dot blot แล้วตรวจสอบแถบสีโปรตีนเมื่อใช้ KPL 1-Component TMB Membrane Peroxidase Substrate (seracare) หรือ chemiluminescence จากการปะพิมพ์หลังจากเติม SuperSignal® West Pico Substrate (Pierce® Fast Western Blot Kit, Thermo Scientific)

การวิเคราะห์การแสดงออกของ NS3 gene ด้วยวิธี qRT-PCR

HepG2 ที่ผ่านการ transfection 3 วัน ได้ถูกนำมาสกัด total RNA ด้วย Trizol reagent ในอัตราส่วน 1 ml ต่อ 50-100 mg น้ำหนักของเซลล์ และ protease inhibitor cocktail 10 μ l แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 0.2 ml Chloroform ต่อ 1 ml Trizol reagent ผสมให้เข้ากันด้วยการใช้มือเขย่าเป็นเวลา 15 วินาที แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 นาที จากนั้นปั่นที่ 12000xg เป็นเวลา 15 นาทีที่ 4°C แล้วถ่ายโอนส่วนใส ชั้นบนที่ประกอบด้วยส่วนของ RNA ไปยังหลอดใหม่ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติม 0.5 ml isopropanol ลงไปในอัตราส่วนต่อ 1 ml Trizol reagent ที่ใช้ในการ lysis ตอนต้น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องแล้ว บ่มเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปั่นที่ 12000xg เป็นเวลา 10 นาทีที่ 4°C เก็บส่วนตะกอนลักษณะคล้ายเจลที่กั้นหลอด และทิ้ง supernatant ไป นำตะกอนที่ได้ไป resuspend ใน 1 ml 75% ethanol อัตราส่วนต่อ 1 ml Trizol reagent ที่ใช้ในการ lysis ตอนต้น แล้ว vortex เบาๆ จากนั้นนำไปปั่น 7500xg เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4°C แล้วปล่อยให้แห้งประมาณ 5-10 นาที resuspend pellet ใน 30 μ l DEPC water (RNAase-free water) แล้วบ่ม 55-60°C เป็นเวลา 15 นาทีแล้วนำไปทดลองในขั้นต่อไปหรือเก็บที่ -70°C

การวิเคราะห์ผลการแสดงออกของ NS3 gene เริ่มต้นด้วยการสังเคราะห์สาย cDNA จาก RNA ด้วย SuperScript® III first-strand synthesis system for RT-PCR (Invitrogen) โดยผสม 5 μ M Oligo (dT) primer, 1 mM dNTPs mix และ 1pg-5 ug total RNA ที่สกัดจาก HepG2 cell line ในปริมาตรรวม 10 μ l แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อ denature RNA และคงสภาพไว้ด้วยการวางทิ้งไว้ในน้ำแข็ง ประมาณ 2 นาที แล้วทำปฏิกิริยา annealing ต่อในปฏิกิริยารวมทั้งหมด 20 μ l ที่ประกอบด้วย 1XRT buffer, 5 mM MgCl₂, 2 U RNaseOut และ 10U SuperScript® III ผสมให้เข้ากัน ตามด้วยขั้นตอน cDNA synthesis ด้วย

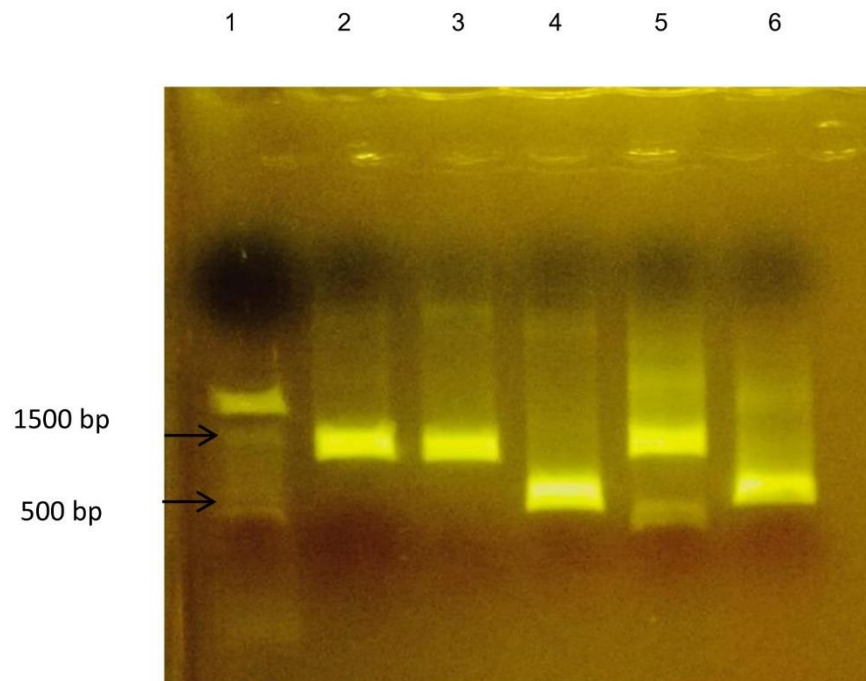
reverse transcriptase ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 50 นาที ได้ first strand DNA ที่เป็นผลผลิตที่ผสมอยู่กับ RNA template จากนั้นหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 85°C เป็นเวลา 5 นาทีปั่นเบาๆ ให้ส่วนผสมจากข้างหลอดไหลมารวมกันแล้ววางไว้ในน้ำแข็ง 2 นาที ตามด้วยการกำจัด RNA template ด้วย 0.1 U RNaseH ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 นาที

First-strand DNA ที่ได้ นำเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR เพื่อสร้าง cDNA ที่มีส่วนประกอบด้วย 1xGC buffer, 0.2 mM dNTPmix, 0.5 mM forward และ reverse primer ที่จับจำเพาะต่อ HCVg3a, HCVg6f หรือ GAPDH house-keeping gene ที่ใช้เป็น internal control โดยขยายเพิ่มจำนวนด้วย 0.01U Phusion DNA polymerase ในปริมาตร 50 μ l ได้ผลผลิตเป็น cDNA ดังปฏิกิริยาที่แนะนำมากับ Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Scientific) โดยใช้ HCVg3a (G3aRT_F และ HCVG3a stop R primer) , HCVg6f (G6fRT_F และ HCVG6f stop R primer) และ GAPDH (GAPDH F315 และ GAPDH R628 primer) ด้วย annealing temp ที่อุณหภูมิ 48.3, 60.5, 60°C ตามลำดับ นำผลผลิตที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ได้ชิ้นส่วนของ cDNA ขนาดประมาณ 131, 190 และ 313 bp ตามลำดับและนำ cDNA ผลผลิตที่ได้เข้าสู่ปฏิกิริยา qPCR (Luna® universal qPCR master mix, New England Biolab) ดังปฏิกิริยาที่แนะนำมากับชุดทดสอบ ที่ประกอบด้วย 1X qPCR master mix, 0.25 μ M forward และ reverse primer และ DNA template ปริมาณตามความเหมาะสมในปริมาตรรวม 20 μ l ด้วย initial denaturation ที่ 95°C, 1 นาที, denaturation, annealing, extension; 95°C 15 วินาที; 60°C 1 นาที และ 80°C, 30 วินาที ตามลำดับจำนวน 45 cycles และ melt curve 95°C 1 นาที

ผลการวิจัย

การสร้าง DNA vaccine

เนื่องจาก NS3-NS4A gene มีความยาวประมาณ 2100 kb ที่จัดว่าค่อนข้างมีขนาดความยาวและเกินประสิทธิภาพที่ DNA polymerase ที่ใช้กันปกติจะสามารถทำปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนได้ครั้งเดียว ดังนั้นการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีนเป้าหมายจึงต้องทำปฏิกิริยา assembly PCR ด้วยการเพิ่มจำนวน DNA ที่ละชิ้นแล้วนำมาต่อกัน โดยมีการออกแบบ primer ให้ทางปลาย 5' มี Kozak sequence และ ATG start codon และที่ปลาย 3' มี stop codon เพื่อช่วยให้ยีนมีการแสดงออก จากการการเพิ่มจำนวน DNA ชิ้นที่ 1 และ 2 ของ HCV g3a หรือ g6f มีความยาวประมาณ 1300 bp และ 900 bp ตามลำดับ (รูปที่ 3) และภายหลังจาก assembly แล้วได้ชิ้นที่ยาวครบสมบูรณ์ประมาณ 2100 bp (รูปที่ 4) อย่างไรก็ตามปฏิกิริยา assembly PCR พบชิ้นส่วนของ DNA ที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้นด้วยจึงทำการสกัดแยกชิ้นส่วนของ DNA เป้าหมายออกมาทำให้บริสุทธิ์และนำไป cloning เข้าไปใน pcDA3.1⁻ ด้วย homologous recombination โดยใช้ชุดทดสอบ In-Fusion cloning kit ผลจากการสกัด plasmid จาก transformant ที่เจริญบน LA ที่มี 100 µg/m ampicillin ของ HCVg6f จาก 10 transformants พบแถบ DNA band shift เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของ vector เมื่อวิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis (รูปที่ 5) และเมื่อวิเคราะห์ผลด้วย restriction enzyme analysis ตัดด้วย enzyme BamHI และ XbaI พบว่ามี DNA insert ในทุก transformant (รูปที่ 6) และเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ผลด้วย PCR พบแถบ DNA เป้าหมายขนาด 828 bp ได้เหมือนกับ positive control (รูปที่ 7) และในทำนองคล้ายกันจากการสกัด plasmid จาก HCVg3a transformants ที่พบแถบ DNA band shift เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของ vector เมื่อวิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis (รูปที่ 8) จากการวิเคราะห์ผลด้วย restriction enzyme analysis พบทุกตัวอย่างยกเว้น 1.4K มีชิ้นส่วนของ DNA เมื่อตัดด้วย enzyme BamHI และ XbaI (รูปที่ 9) และเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย PCR พบว่ามีเพียง no 1.1K, 1.8K, 1.9K และ 1.10K ยกเว้น transformants no 1.6K ที่มีการเพิ่มขยายชิ้นของ DNA เป้าหมายขนาดพอๆ positive control (รูปที่ 10) อย่างไรก็ตามทุกตัวอย่างให้ผล nonspecific band ด้วย จากผลการวิเคราะห์ทั้งหมดได้ทำการคัดเลือก NS3-NS4A ของ HCVg3a หรือ g6f ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์และนำ HCVg3a no 1.9K และ 1.10K หรือ HCVg6f no .9K และ 1.10K ที่ผ่านการยืนยันแล้วว่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกต้องไปทำการทดลองในการทดสอบการแสดงออกของยีนต่อไป



รูปที่ 3 : การสร้างชิ้นส่วน DNA ที่ประกอบด้วย NS3-NS4A ชิ้นที่ 1 และ 2 ของ HCVg3a หรือ g6f ด้วยปฏิกิริยา PCR

Lane 1: Marker

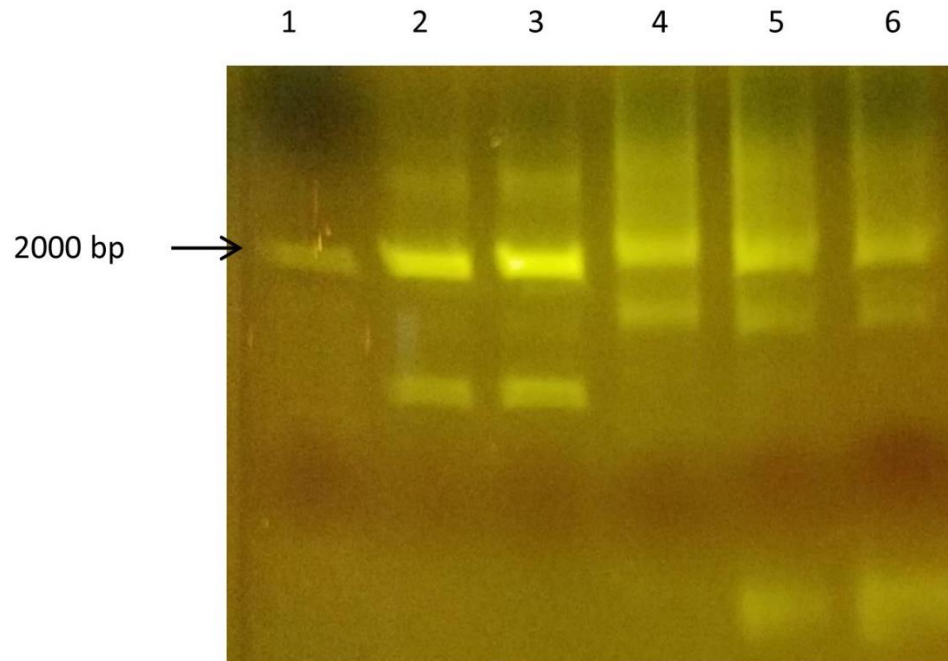
Lane 2: g6f ชิ้นที่ 1 ยาว 1296 bp annealing 52.6°C

Lane 3: g6f ชิ้นที่ 1 1296 bp 63.6C annealing 63.6°C

Lane 4: g6f ชิ้นที่ 2 828 bp 828 annealing 63.6°C

Lane 5: g3a ชิ้นที่ 1 ยาว 1296 bp annealing 60°C

Lane 6: g3a ชิ้นที่ 2 ยาว 867 bp annealing 60°C

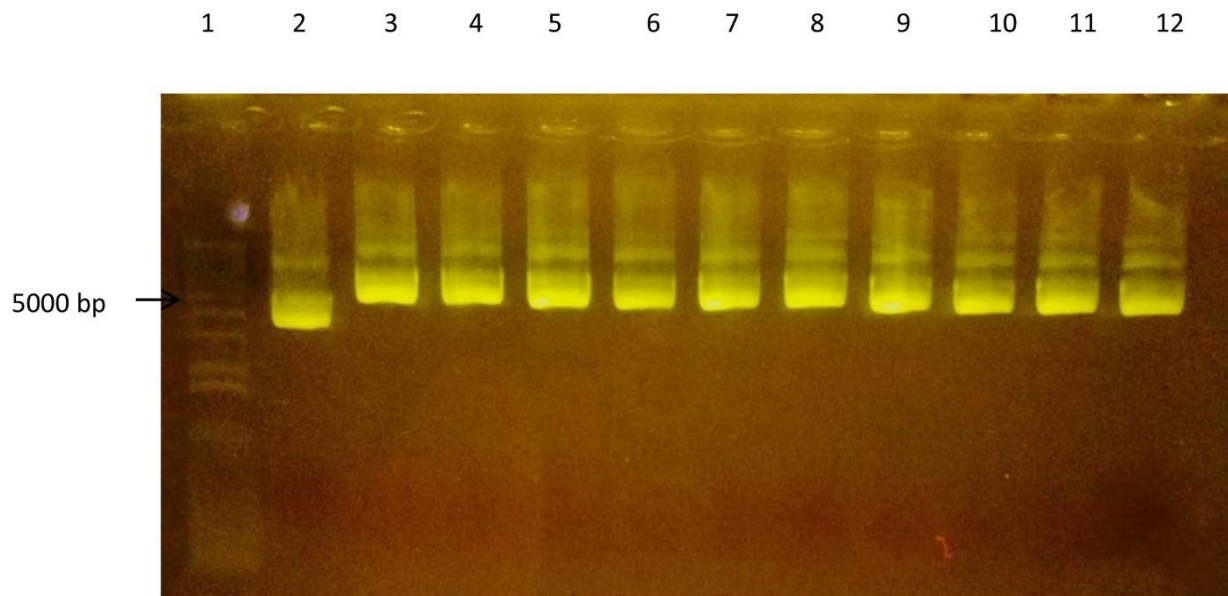


รูปที่ 4 การสร้างชิ้นส่วน DNA ที่ประกอบด้วย NS3-NS4A ทั้งสายของ HCVg3a หรือ g6f ด้วยปฏิกิริยา assembly PCR

Lane 1: Marker

Lane 2-3 : 2104 bp ของ g6f

Lane 4-6: 2124 bp ของ g3a

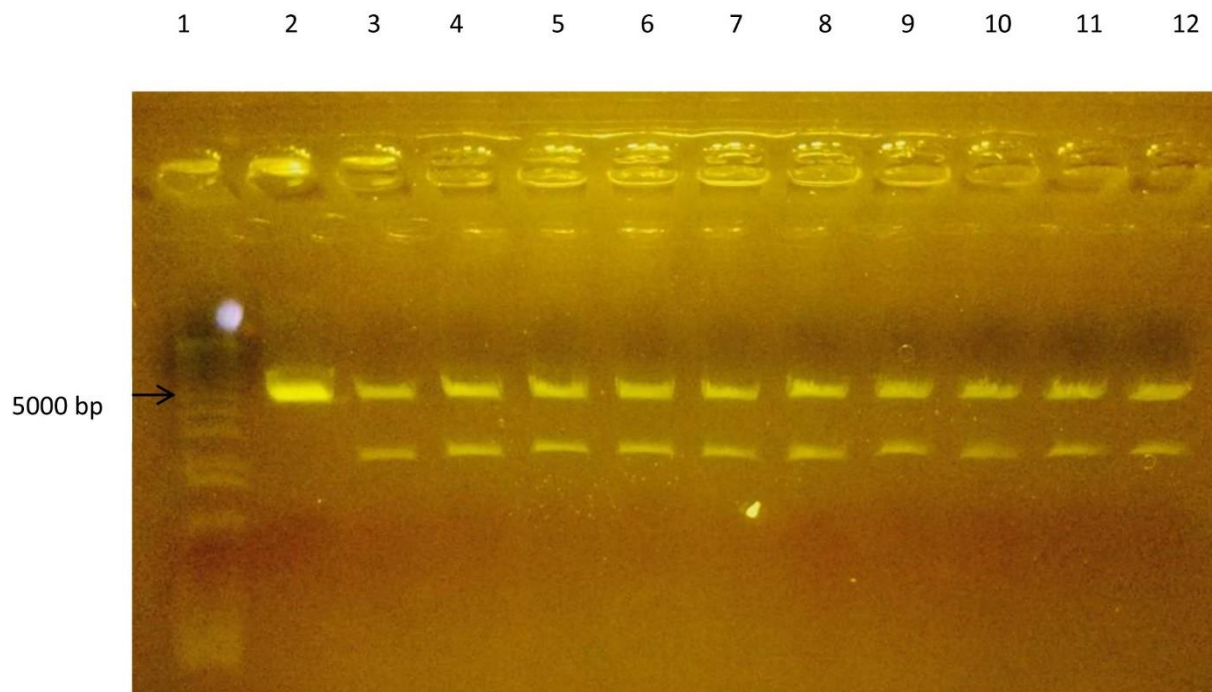


รูปที่ 5 plasmid ที่สกัดจาก transformants ของ HCVg6f

Lane 1: Marker

Lane 2: pcDNA3.1⁺

Lane 3-12: plasmid จาก transformants no 1-10

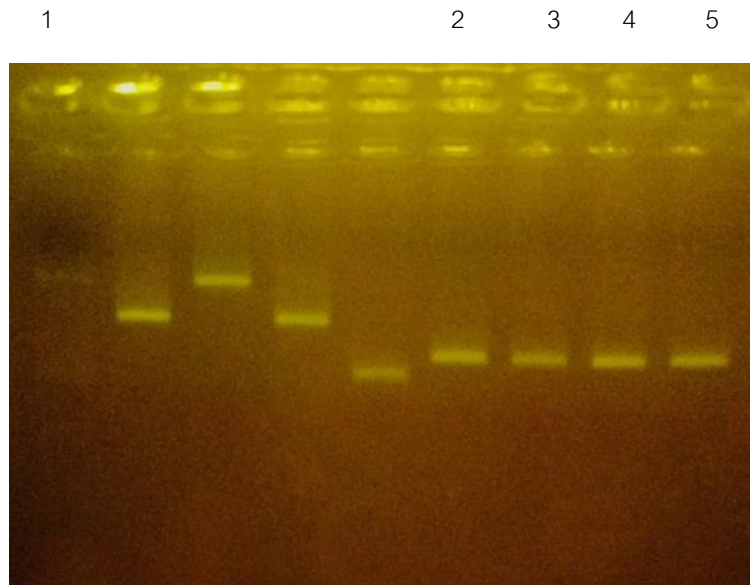


รูปที่ 6 Restriction enzyme analysis ของ HCVg6f transformants ด้วย BamHI-XbaI

Lane 1: Marker

Lane 2: pcDNA3.1

Lane 3-12 : transformants no 1-10

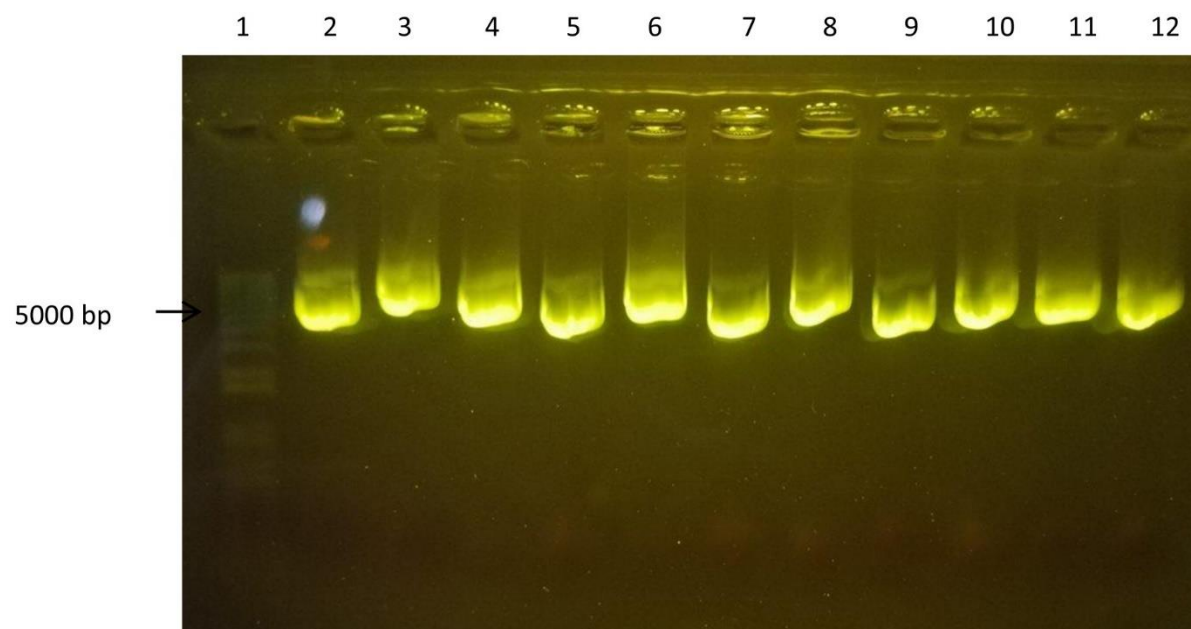


รูปที่ 7 PCR analysis ของ HCVg6f transformants

Lane 1: Marker

Lane 2: 828 bp DNA fragment, positive control

Lane 3-5 : 828 bp DNA fragment ของ HCVG6f transformants

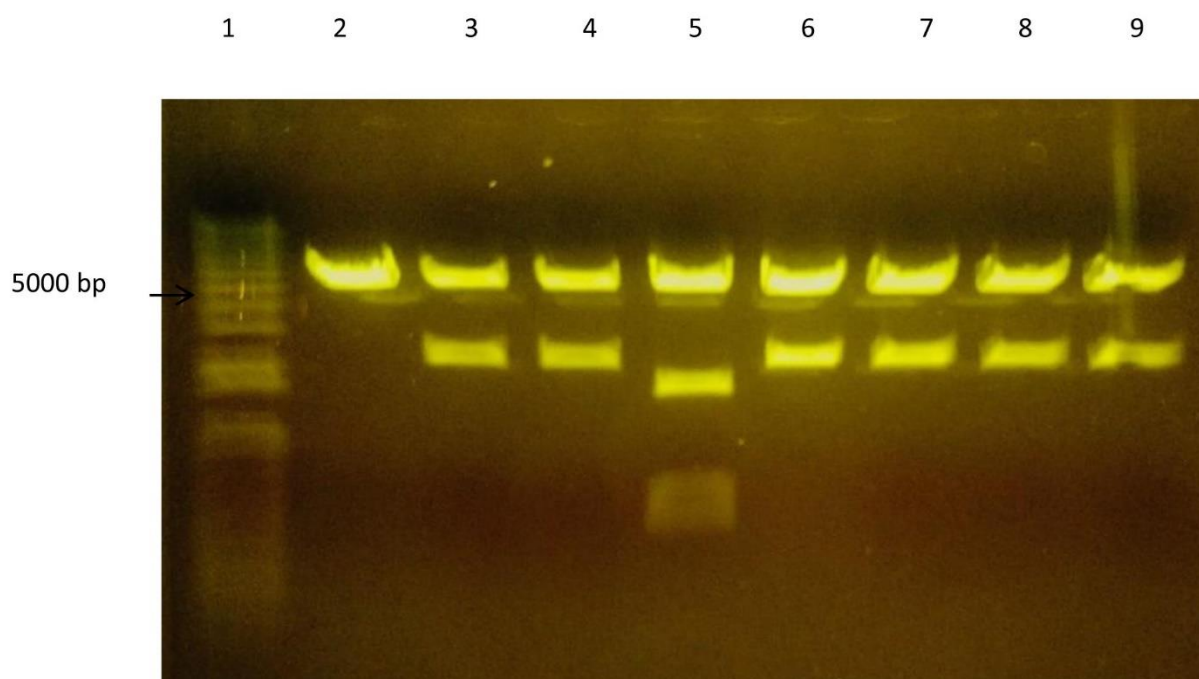


รูปที่ 8 plasmid ที่สกัดจาก transformants ของ HCV g3a

Lane 1: Marker

Lane 2: pcDNA3.1⁻

Lane 3-12: plasmid จาก transformants no 1-10



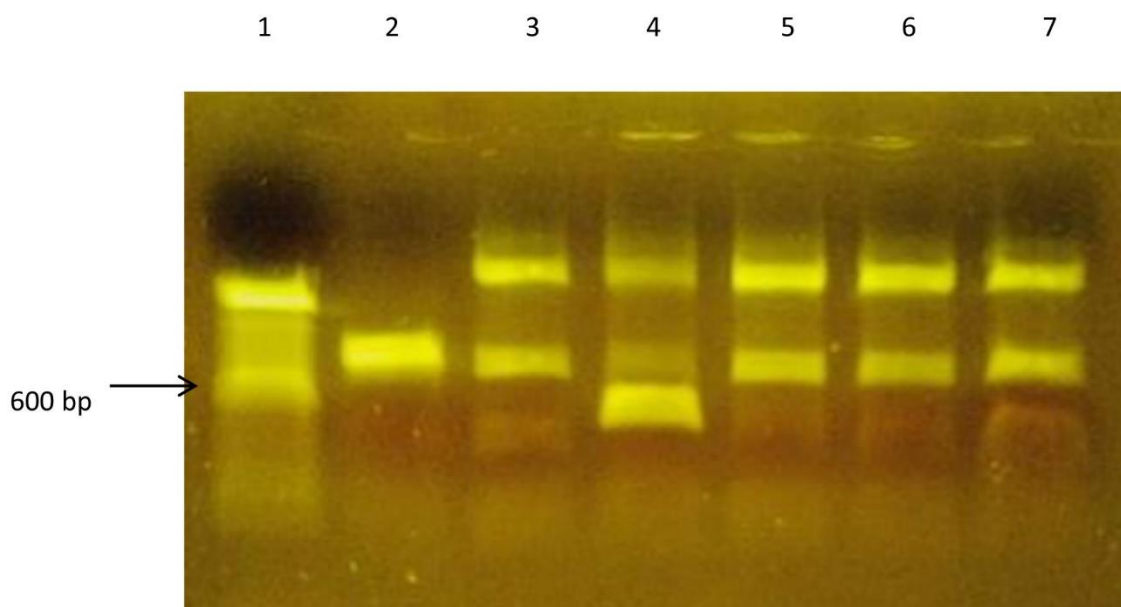
รูปที่ 9 Restriction enzyme analysis ของ HCVg3a transformants ด้วย BamHI-XbaI

Lane 1: Marker

Lane 2: pcDNA3.1⁻ (negative control)

Lane 3: pcDNA/g3a เก๋า (positive control)

Lane 4-9 :transformants no 1.1, 1.4, 1.6, 1.8, 1.9 และ 1.10K ตามลำดับ



รูปที่ 10 PCR analysis ของ HCVg3a transformants

Lane 1: Marker

Lane 2: pcDNA3.1/g3a (positive control)

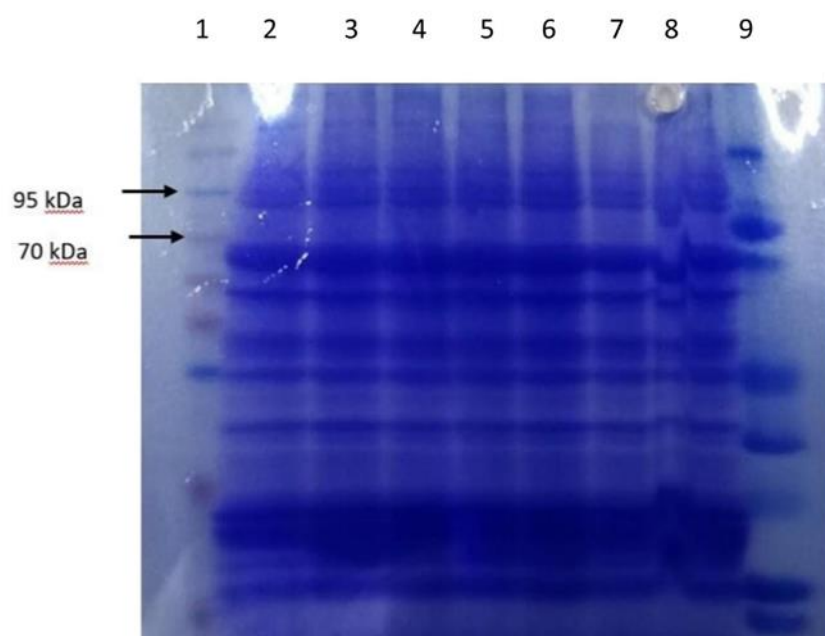
Lane 3-7 : transformants g3a no 1.1K, 1.6K, 1.8K, 1.9K และ 1.10K

การแสดงออกเป็นโปรตีน

Recombinant plasmid ที่ประกอบด้วย NS3-NS4A ของ HCVg3a หรือ g6f ได้ถูกนำไปเปลี่ยนแปลง codon ให้เหมาะกับการแสดงของยีนภายใน mammalian cell line HEPG2 ที่มีต้นกำเนิดมาจาก human liver cells และนำมาทดสอบเปรียบเทียบกับ Recombinant plasmid ที่มีลำดับ nucleotide แบบ wild-type จากการทดสอบด้วย in Vitro transcription และ translation และวิเคราะห์ผลด้วยการนำโปรตีนใน crude extract มาแยกออกจากด้วย SDS-PAGE gel electrophoresis และย้อมสีด้วย Commassie brilliant blue พบว่าทุกตัวอย่างมีรูปแบบของโปรตีนไม่มีความแตกต่างจาก HEPG2 cell ที่ transfect ด้วย pcDNA3.1 vector ที่ใช้เป็น negative control ((รูปที่ 11, lane 2) และเมื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี western blot โดยใช้ rabbit anti-HCV NS3

polyclonal antibody (ab250686, Abbiotect) พบแถบโปรตีนเป้าหมายที่มีขนาดประมาณ 74 kDa (รูปที่ 12) ที่มีความเข้มจางๆ HCV g3a ที่มีลำดับ nucleotide แบบ wild-type ทั้ง 2 ตัวอย่าง

เมื่อนำ recombinant plasmid ทั้งหมดนำเข้าไปภายใน HEPG2 cell line หลังจาก transfection ในวันที่ 2 และ 3 ได้สกัดโปรตีนนำมาทดสอบการแสดงออกของ NS3 gene ด้วยวิธี dot bot ด้วย rabbit anti-HCV NS3 polyclonal antibody (ab250686, Abbiotect) เพื่อทดสอบหาวันที่มีการแสดงออกของโปรตีนมากที่สุด จากผลการทดลองพบว่า หลังจาก transfection วันที่ 3 น่าจะมีการแสดงออกของยีนดีกว่าวันที่ 2 ที่มีจุดโปรตีนสีจางๆ และไม่จำเพาะ โดย g3a 1.10K, g6f 2K และ 3K มีจุดโปรตีนที่มีสีเข้มกว่าตัวอย่างอื่นและไม่พบจุดสีของ negative control Mock cell ที่ไม่มีการ transfection (M0) และ cell ที่ transfection ด้วย vector (pcDNA3.1) (รูปที่ 13) อย่างไรก็ตามเมื่อนำโปรตีนที่สกัดได้มาแยกด้วย SDS-PAGE และวิเคราะห์ผลด้วย western blot ด้วย rabbit anti-HCV NS3 polyclonal antibody (ab250686, Abbiotect) ไม่พบแถบโปรตีนเป้าหมายที่มีขนาดประมาณ 74 kDa (รูปที่ 14)



รูปที่ 11 SDS-PAGE จาก in Vitro transcription และ translation

Lane 1: Chromatein prestained protein ladder (Vivantis)

Lane 2: pcDNA3.1⁻ (negative control)

Lane 3: g3a optimized codon

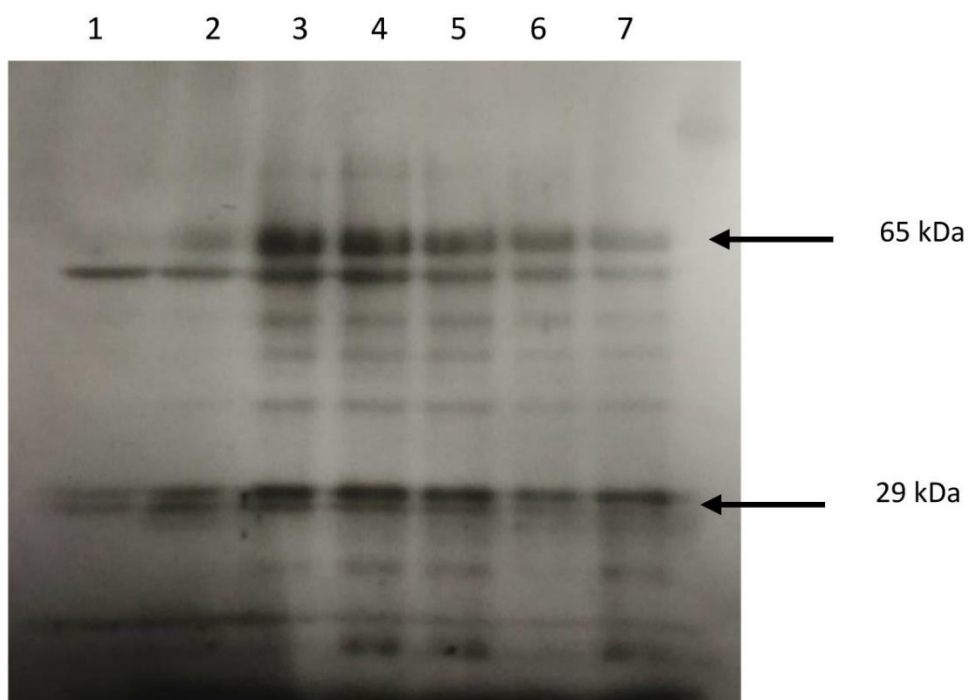
Lane 4: g3a (1.9K)

Lane 5: g3a (1.10K)

Lane 6: g6f optimized codon

Lane 7: g6f (2K)

Lane 8: g6f (3K)



รูปที่ 12 Western blot จาก in Vitro transcription และ translation

Lane 1: pcDNA3.1⁻

Lane 2: g3a optimized codon

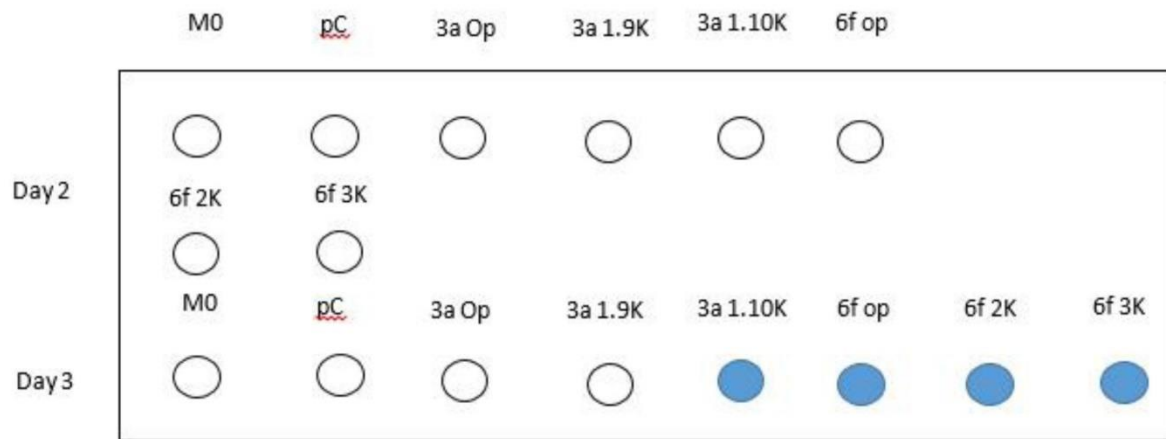
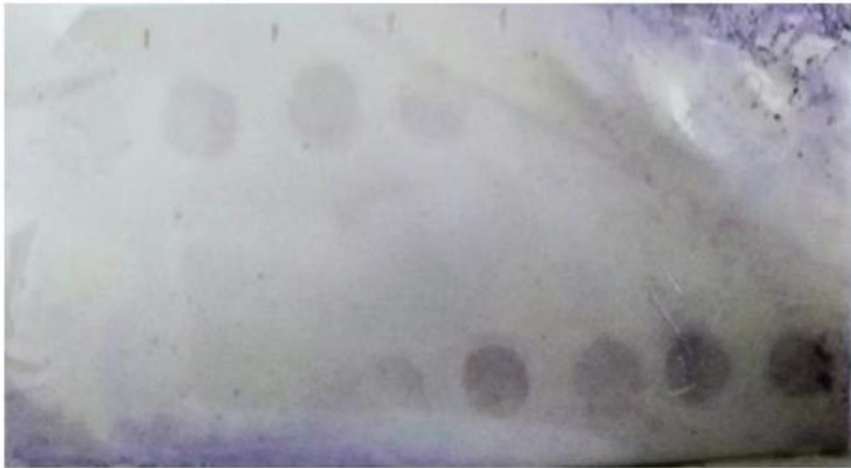
Lane 3: g3a (1.9K)

Lane 4: g3a (1.10K)

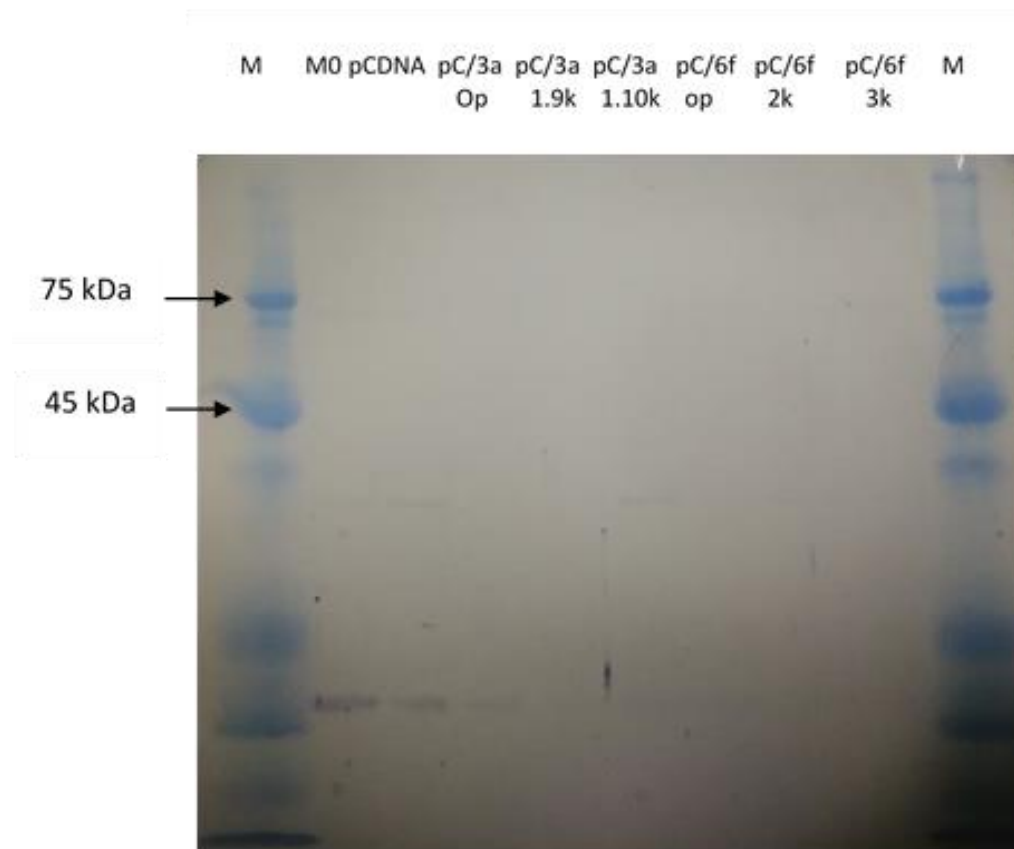
Lane 5: g6f optimized codon

Lane 6: g6f (2K)

Lane 7: g6f (3K)



รูปที่ 13 dot blot analysis จาก HepG2 transfected cell

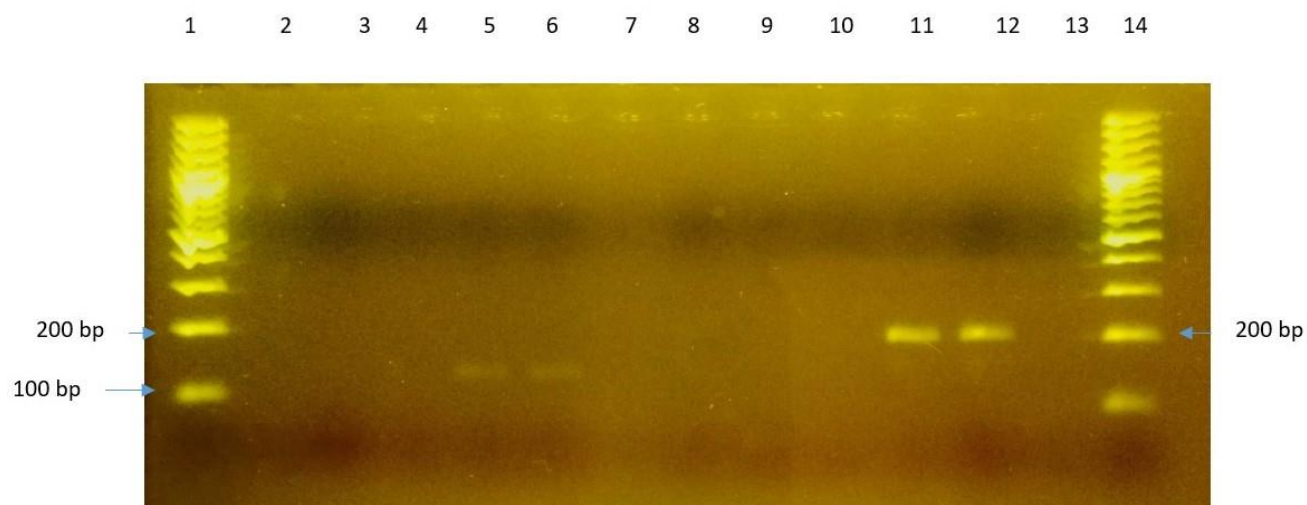


รูปที่ 14 Western blot analysis จาก HepG2 transfected cell

การแสดงออกเป็น RNA

จากการวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีนด้วยวิธี real-time PCR เพื่อหาค่า relative gene expression ของ recombinant plasmid เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ transfection ด้วย vector (pcDNA3.1-) ที่ใช้เป็น negative control โดยเริ่มต้นได้ทำปฏิกิริยา RT ตามด้วย PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมาย จากผลผลิตที่ได้พบว่าตัวอย่างจาก g3a หรือ g6f มีการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของ DNA เป้าหมายได้ขนาดของผลผลิตตามที่คาดไว้ ประมาณ 131 และ 190 bp ตามลำดับ และไม่พบผลผลิต DNA จาก M0 และ pcDNA3.1⁻ negative control (รูปที่ 15) ส่วน GAPDH ที่เป็น endogenous gene ที่ใช้ใน normalization ได้ขนาดของผลผลิตตามที่คาดไว้ประมาณ 313 bp (ไม่ได้แสดงรูป) หลังจากนำชิ้นส่วน DNA ไปทดสอบต่อด้วยปฏิกิริยา real-time PCR ได้ค่า ct ที่แตกต่างกัน และมี melting curve ที่ตำแหน่งเดียวกัน (รูปที่ 16-21) และสรุปค่า ct ที่ได้ไว้ในตารางที่ 2 จากผลการ

วิเคราะห์ relative gene expression ของ NS3 gene พบว่า 1.9K และ 1.10K มีการแสดงออกของยีนสูงถึง 24-27 ล้านเท่า ส่วน g3a optimized codon มีการแสดงออกของยีนประมาณ 4 ล้านเท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ PcDNA3.1 ที่ใช้เป็น negative control ส่วน g6f 2K เท่านั้นที่มีการแสดงออกได้ดีประมาณ 4 ล้านเท่า ซึ่งดีกว่า g6f 3K ที่มีการแสดงออกเพียงประมาณกว่า 1 แสนเท่า ส่วน g6f optimized codon มีการแสดงออกของยีนน้อยมาก ประมาณ 1000 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับ vector control



รูปที่ 15 การสร้าง cDNA ของ HepG2 cell line transfect ด้วย pcDNA3.1/g3a หรือ g6f

Lane 1 และ 14: Marker

Lane 2 และ 8: non-transfected cells (Mo)

Lane 3 และ 9: pcDNA3.1⁻

Lane 4: optimized codon g3a

Lane 5: wild-type codon g3a 1.9K

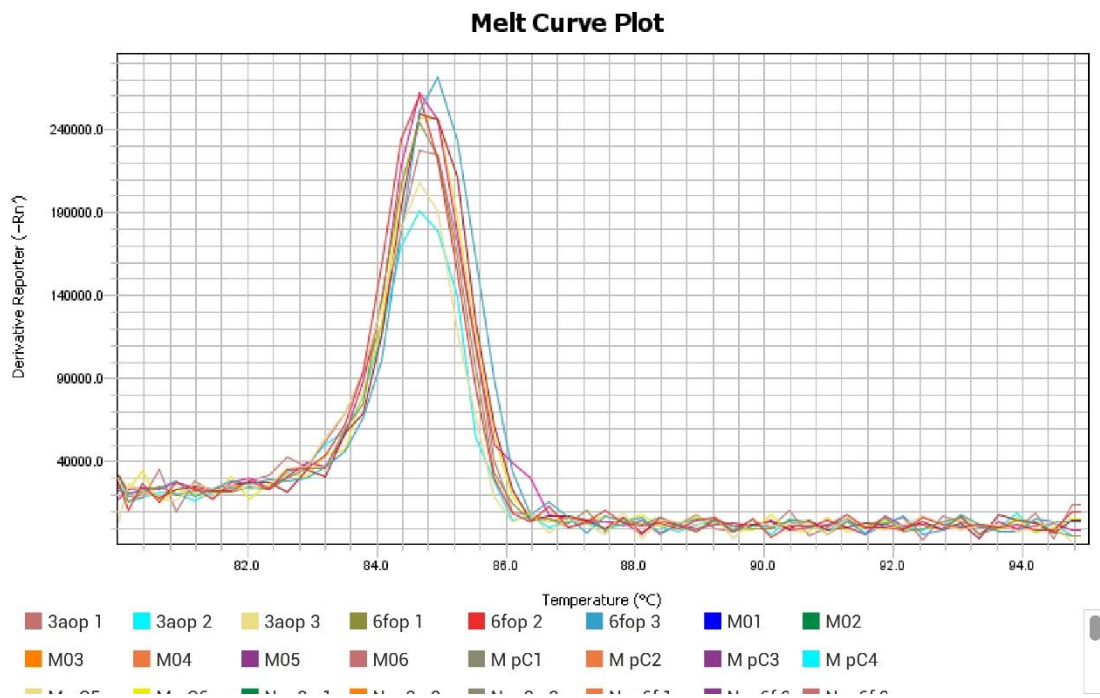
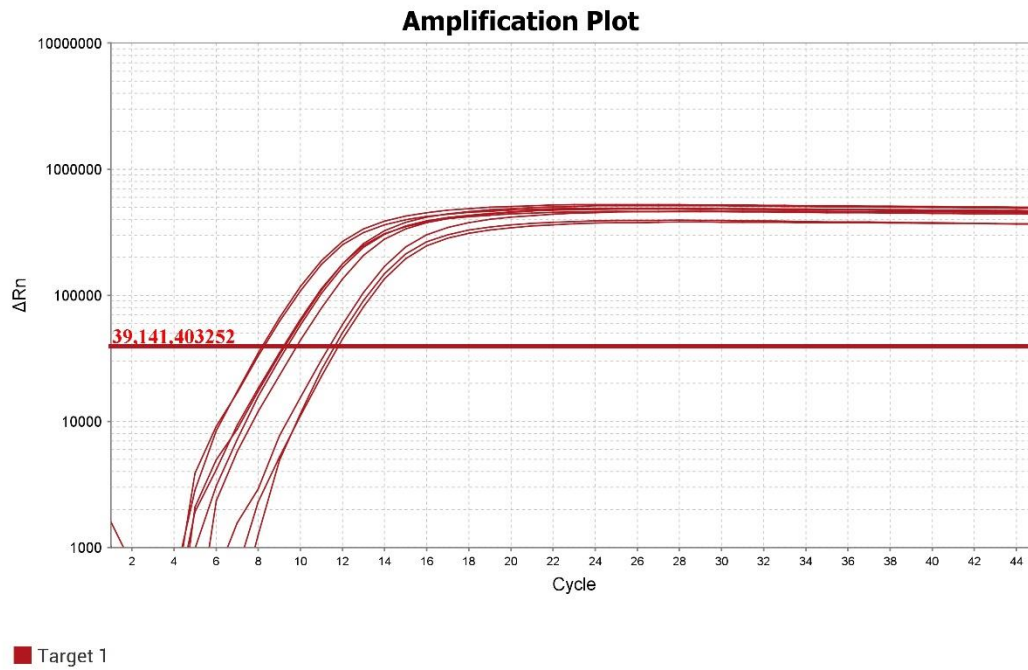
Lane 6: wild-type codon g3a 1.10K

Lane 7 และ 13: negative

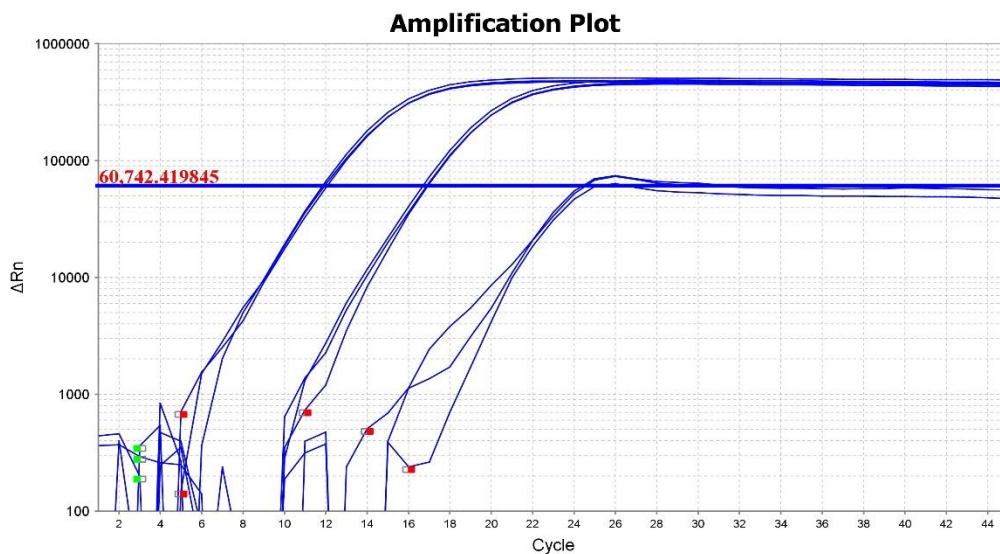
Lane 10: optimized codon g6f

Lane 11: wild-type codon g6f 2K

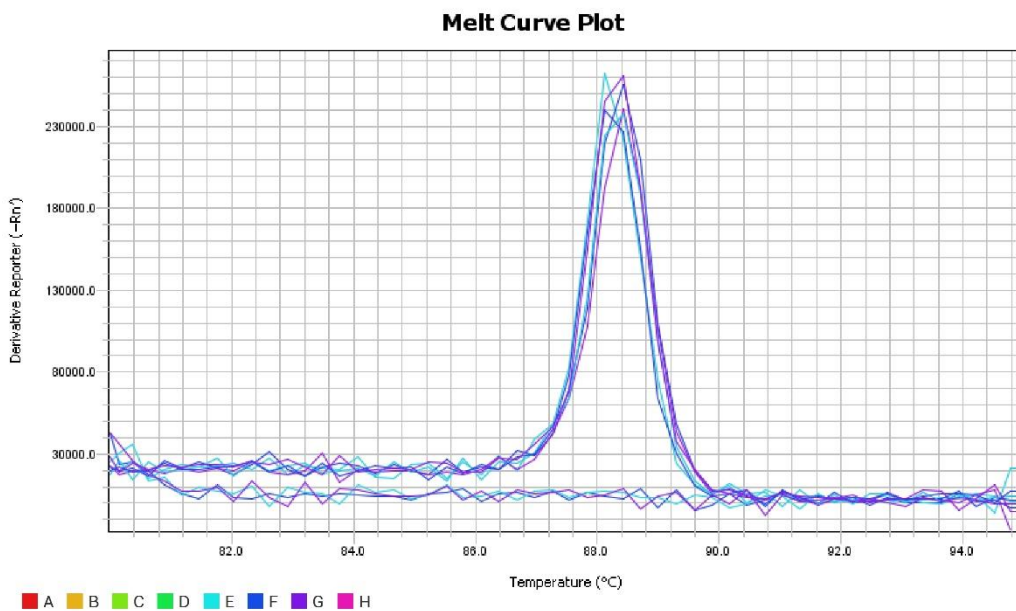
Lane 12: wild-type codon g6f 3K



รูปที่ 16 การเพิ่มจำนวน NS3-NS4A ด้วย real-time PCR ของ HepG2 ที่ transfection ด้วย pcDNA3.1⁺/HCVg3a

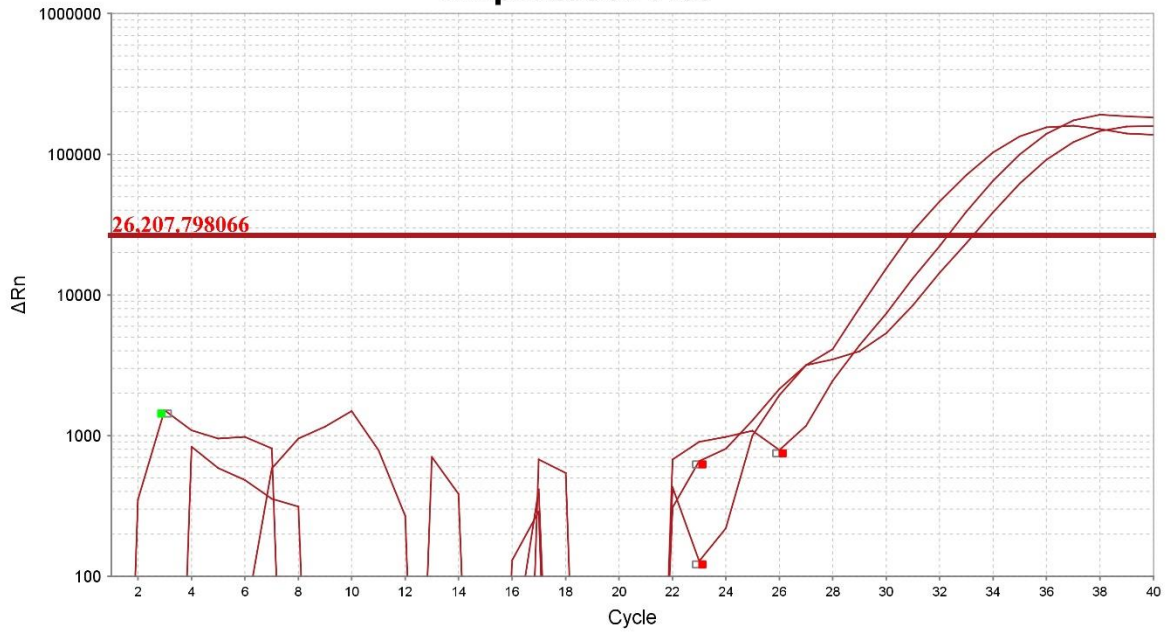


■ Target 2



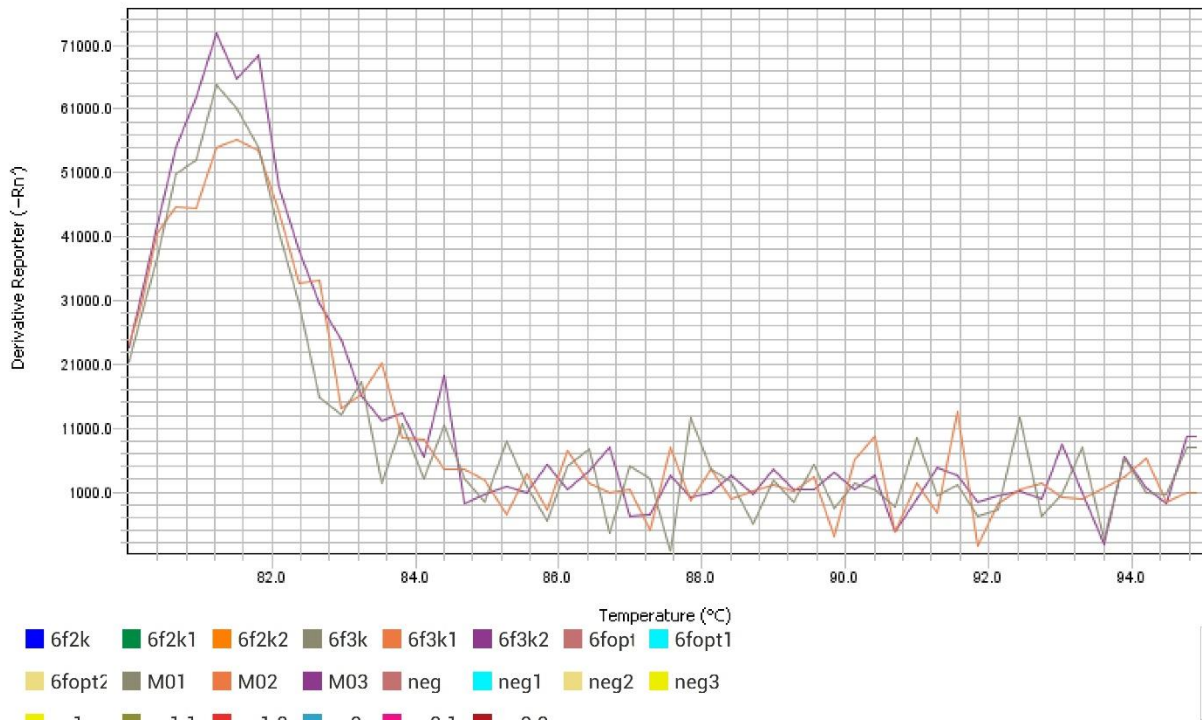
รูปที่ 17 การเพิ่มจำนวน NS3-NS4A ด้วย real-time PCR ของ HepG2 ที่ transfection ด้วย pcDNA3.1/HCVg6f

Amplification Plot

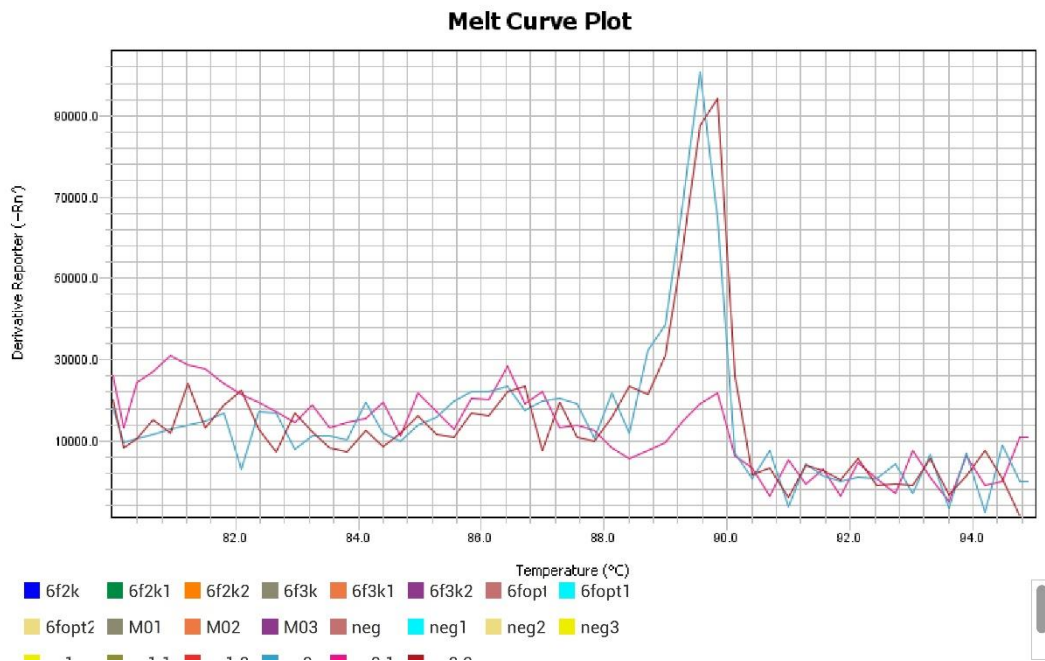
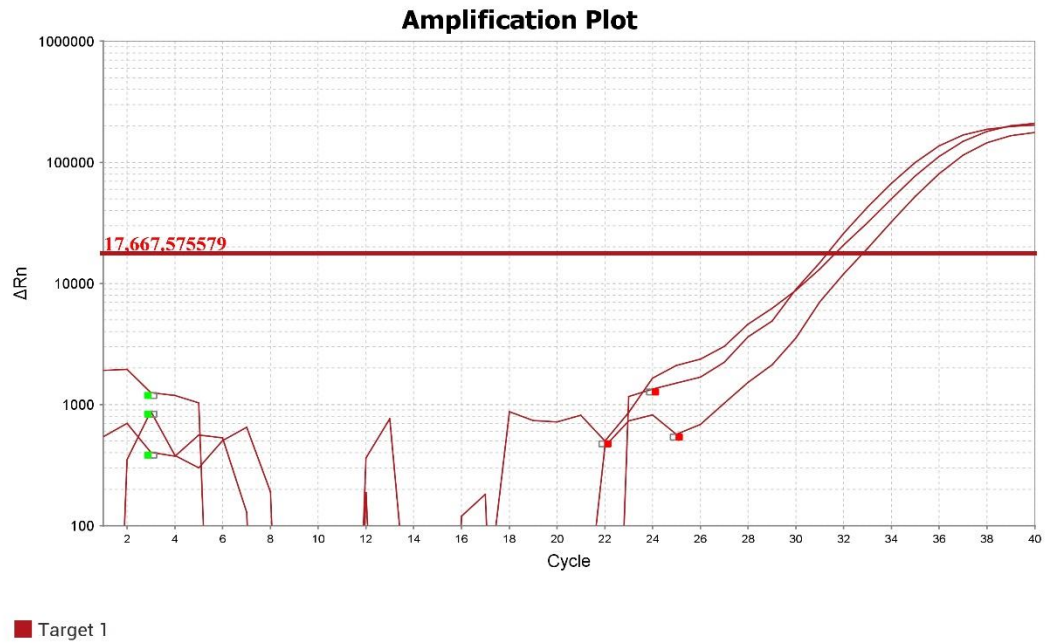


■ Target 1

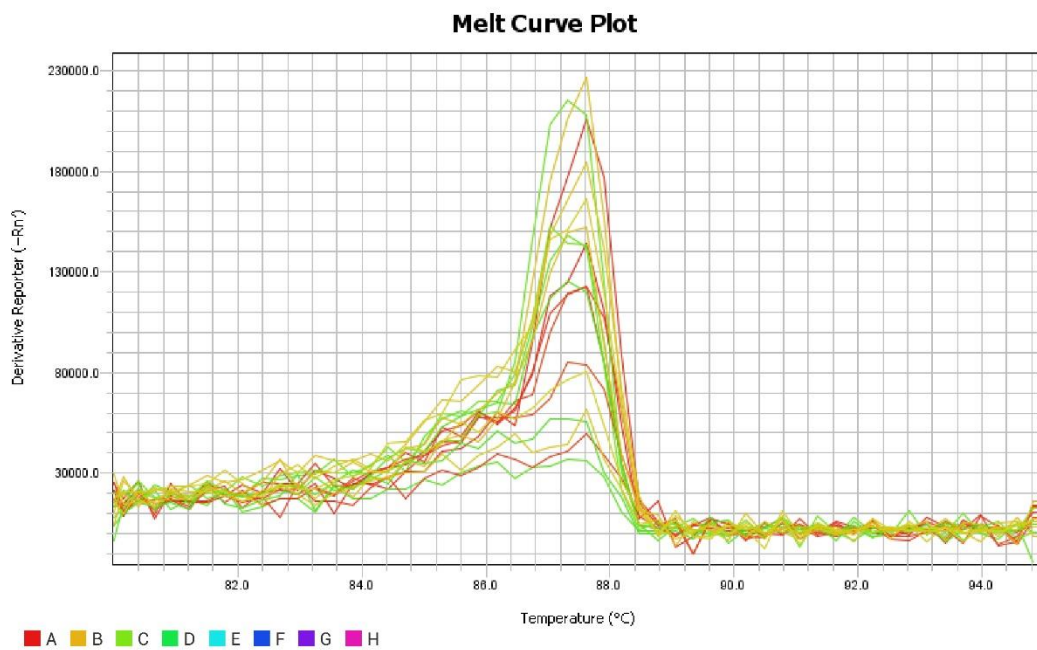
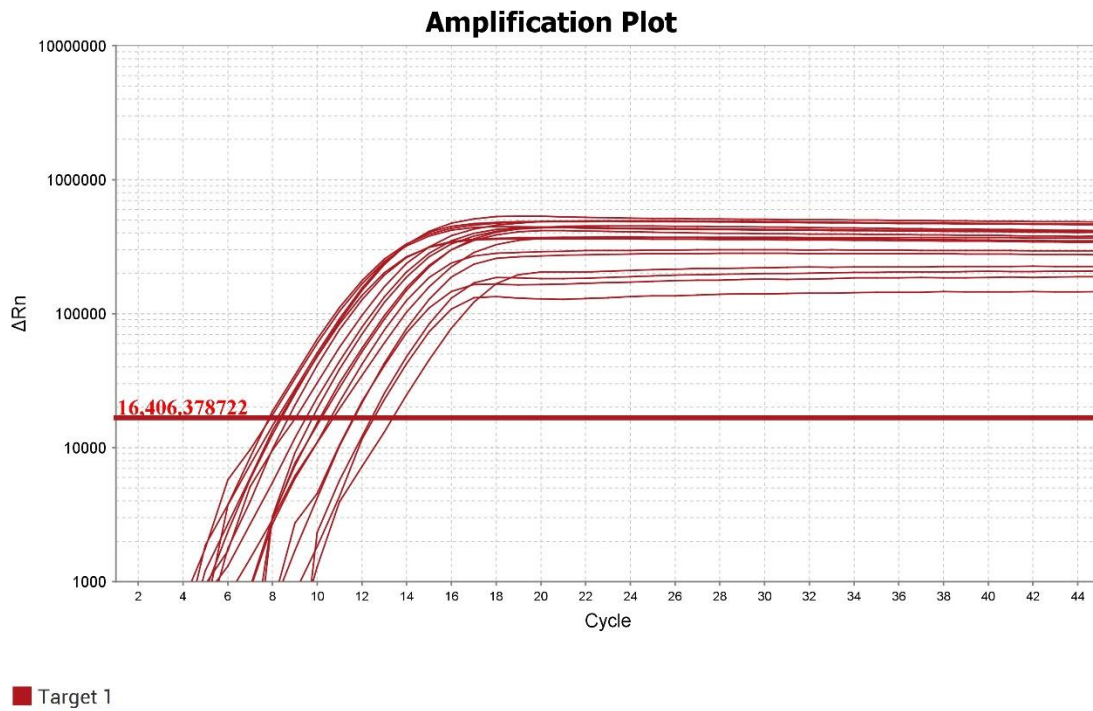
Melt Curve Plot



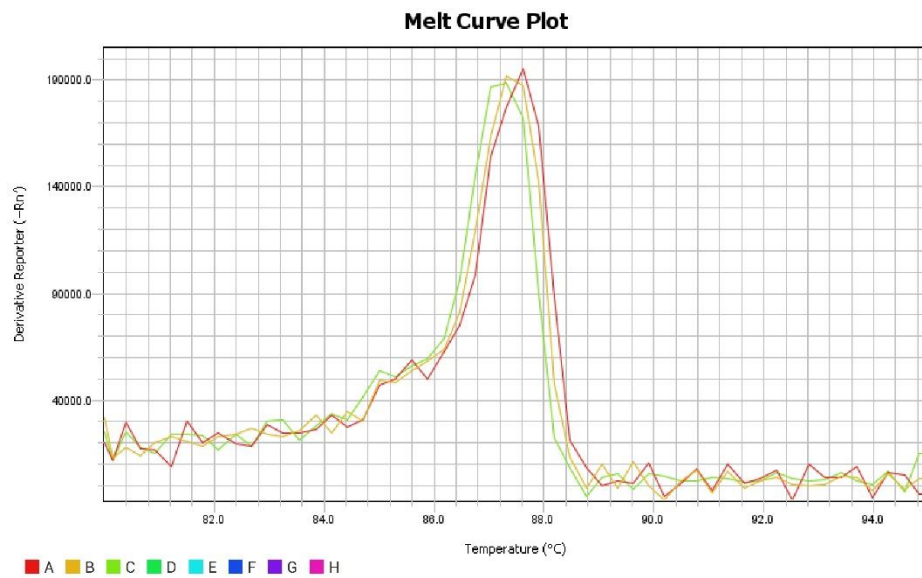
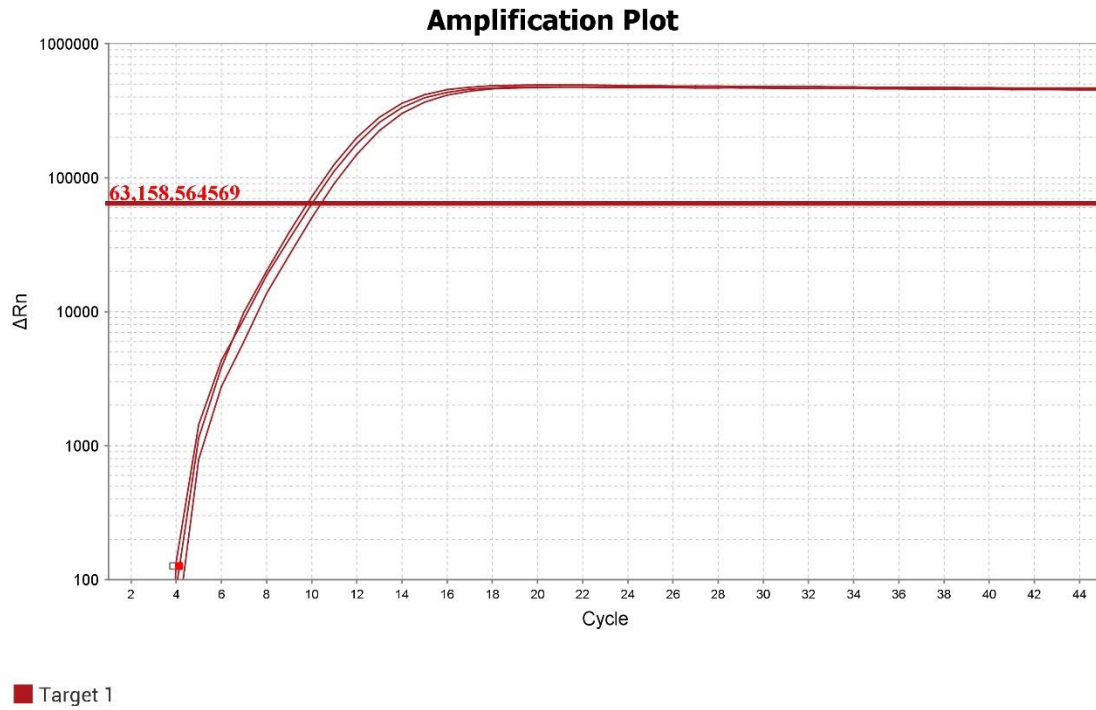
รูปที่ 18 real-time PCR ของ HepG2 ที่ transfection ด้วย non-transfected cells (Mo)



รูปที่ 19 real-time PCR ของ HepG2 ที่ transfection ด้วย pcDNA3.1 vector control



รูปที่ 20 การเพิ่มจำนวน GADPH endogenous control ด้วย real-time PCR ใน cell-transfected ด้วย HCVg3a หรือ g6f



รูปที่ 21 การเพิ่มจำนวน GAPDH endogenous control ด้วย real-time PCR ใน cell-transfected ด้วย pcDNA3.1-

ตารางที่ 2 สรุป Relative gene expression ของยีนเป้าหมายเมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม

Sample	Ct of NS3A (target gene)	Ct of GAPDH (reference gene)	Δ ct (ct target- reference gene)	$\Delta\Delta$ ct (Δ ct target- Δ ct calibrator)	fold expression = $2^{-\Delta\Delta$ ct)
Pc (calibrator)	31.93	9.74	22.19	0	1
g3a optimized	9.99	9.74	0.25	-21.94	4,023,445
g3a 1.9K	7.22	9.74	-2.52	-24.71	27,444,239
g3a 1.10K	7.39	9.74	-2.35	-24.54	24,393,611
g6f optimized	21.85	9.74	12.11	-10.08	1,082.386
g6f 2K	10.06	9.74	0.32	-21.87	3,832,887
g6f 3K	14.96	9.74	5.22	-16.97	128,374.6

อภิปราย/วิจารณ์ (Discussion)

ไวรัสตับอักเสบชนิดซี (HCV) เป็นไวรัสที่มีการกลายพันธุ์สูงมาก สามารถแบ่งออกได้เป็นหลายสายพันธุ์ และยังแบ่งย่อยออกได้หลาย subtypes จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างทั้งหมด 67 ตัวอย่างของผู้ติดเชื้อ HCV จากงานวิจัยที่ผ่านมาด้วย ยืนยันได้ว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ HCV จริง และสามารถจำแนกออกเป็น 4 genotypes โดยมีการเรียงลำดับตามความชุกจากมากไปหาน้อยได้แก่ genotype 1, 6, 3 และ 4 ที่มีความชุกคิดเป็นร้อยละ 49.25, 26.87, 22.39 และ 1.49 ตามลำดับ เนื่องจาก HCV มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากจึงสามารถจำแนก genotype ออกเป็น subtypes ย่อยต่างๆ ได้ โดย genotype 1 ที่พบมีการระบาดทั่วโลก และพบมากที่สุดจากผลการวิจัยที่ผ่านมาด้วย ส่วน genotype 6 ที่พบมากในประเทศไทยและทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีความชุกคิดเป็นร้อยละ 26.87 สามารถจำแนกออกเป็น 6 subtypes ได้แก่ 6a, 6e, 6f, 6h, 6n, และ 6o โดยที่ 6f มีความชุกมากที่สุดในการศึกษาที่ผ่านมาด้วย คิดเป็นร้อยละ 11.94 ส่วน genotype 3 ที่พบระบาดมากในทวีปเอเชียและเคยเป็น genotype ที่เคยพบมากที่สุดพบมีความชุกเป็นอันดับ 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 ที่ประกอบด้วย NS3-NS4A gene แทรกเข้าไปภายใน pcDNA3.1⁺ 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 ของ NS3 serine protease activity ดังนั้นการสร้าง DNA vaccine ต่อ NS3-4A complex จึงมีบทบาทสำคัญในการขัดขวาง replication ของไวรัส

เนื่องจาก NS3-NS4A gene มีความยาวประมาณ 2.1 kb ที่จัดว่าค่อนข้างยาวเกินประสิทธิภาพที่ DNA polymerase ที่ใช้กันปกติจะสามารถทำปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนได้ในครั้งเดียว ดังนั้นการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีนจึงต้องทำปฏิกิริยา assembly PCR โดยเพิ่มจำนวนทีละชิ้น แล้วนำมาต่อกัน จากการผลการทดลองการเพิ่มขยายยีนเป้าหมาย โดย DNA ชิ้นที่ 1 ของ HCVg6f ที่มีความยาวประมาณ 1300 bp สามารถเพิ่มขยายจำนวน DNA ได้ annealing temperature ที่อุณหภูมิ 52.6°C หรือ 63.6°C และ ชิ้นที่ 2 ยาว 900 bp มี annealing

temperature ที่อุณหภูมิ 52.6°C หรือ 63.6°C และในทำนองเดียวกัน HCV g3a มีการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของชิ้นที่ 1 และ 2 ที่มีขนาดความยาว 1300 และ 900 bp แต่มี annealing temperature ที่อุณหภูมิ 60.0°C เท่ากัน การที่ annealing temperature มีความแตกต่างกันนั้นขึ้นกับความยาวและชนิดของเบสที่เป็นส่วนประกอบของ primer ที่มีผลต่อ ค่า Tm หลังจากได้ชิ้นส่วนของ DNA ชิ้นที่ 1 และ 2 แล้ว นำมา assembly เข้าด้วยกันด้วยปฏิกิริยา PCR อีกครั้ง โดยใช้คู่ primer ที่จับที่ปลายสุดทาง 5' และ 3' ของ NS3-NS4A gene และกำหนดให้ชิ้นส่วน DNA แต่ละชิ้นมีปริมาณมากกว่า 30 ng จะได้ชิ้น DNA ที่ยาวครบสมบูรณ์ประมาณ 2100 bp อย่างไรก็ตามจากผลที่ปฏิกิริยา PCR ที่ได้ยังพบ nonspecific band ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจาก primer สามารถจับบริเวณอื่นแบบไม่จำเพาะและ annealing temperature อาจยังไม่เหมาะสม จึงจำเป็นต้องทำการตัดแถบ DNA เป้าหมาย แยกออกแถบ DNA ที่ไม่จำเพาะอื่นๆ ออกมาจาก agarose gel เพื่อนำไป insert เข้าไปใน vector ต่อไป

NS3-NS4A gene ของ HCVg3a หรือ HCV g6f ที่มีขนาดประมาณ 2.1 kb ได้ถูกนำไป insert เข้าไปใน pcDNA3.1⁺ vector ด้วย homologous recombination ด้วยชุดทดสอบ In-Fusion cloning kit (Clontech) หลังจาก transform เข้าสู่ JM109 competent cells ด้วยวิธี heat shock แล้วมีการคัดเลือก recombinant colonies ที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LA ที่มี 50 µg/ml kanamycin นำมาสกัด plasmid เพื่อพิสูจน์ความถูกต้องของชิ้น DNA insert โดยการตรวจคัดกรองขั้นแรกใช้วิธีการวิเคราะห์บน 0.8% agarose gel electrophoresis จากการสังเกตเห็น recombinant plasmid มีการเคลื่อนที่ของแถบ DNA ช้า (band shift) กว่า vector สันนิษฐานว่า recombinant plasmid น่าจะมีชิ้น DNA insert หลังจากนั้นนำมาพิสูจน์ต่อด้วยการตัดด้วย *Bam*HI และ *Xba*I digestion พบชิ้น DNA insert ขนาดประมาณ 2.1 Kb ผลที่ได้สอดคล้องกับวิธีการทดสอบด้วยวิธี PCR ที่ใช้ primer ในการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของ 828 bp ภายในส่วน DNA insert หลังจากรืนยันความถูกต้องด้วย DNA sequencing ที่เป็นวิธีมาตรฐานพบว่ามี NS3-NS4A มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นของ HCVg3a หรือ g6f จริง

recombinant plasmid ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ wild-type หรือที่มีการเปลี่ยนแปลง codon ให้เป็นชนิดที่เหมาะสมกับการแสดงออกภายใน mammalian cell lines แล้วได้ถูกนำมาทำการแสดงออกของยีนเบื้องต้นด้วยวิธี in vitro transcription และ translation โดยเปรียบเทียบกับ pcDNA3.1- vector negative control จากการนำ total protein ที่สร้างได้จากปฏิกิริยามาแยกด้วย SDS-PAGE polyacrylamide electrophoresis พบว่าทุกตัวอย่างมีแถบโปรตีนจำนวนมากและรูปแบบไม่มีความแตกต่างจาก pcDNA3.1 vector negative control จึงอาจเป็นไปได้ว่า non-specific protein อาจมีเป็นจำนวนมากทำให้ background สูงและอาจกลบโปรตีนเป้าหมายที่มีจำนวนน้อยได้ จึงนำไปทดสอบต่อด้วย western blot ด้วย rabbit anti-HCV NS3 polyclonal antibody (ab250686, Abbiotect) พบแถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 74 kDa ที่มีความเข้มจางๆ จากปฏิกิริยาของ g3a ทั้ง 2 ตัวอย่าง (HCV g3a 1.9K และ 1.10K) ที่คาดว่าน่าจะเป็นแถบโปรตีนเป้าหมาย แต่เมื่อนำ recombinant protein ทั้งหมดไป transfect เข้าไปใน HEPG2 ที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ตับ

จากการทดสอบด้วยวิธี dot blot ด้วย rabbit anti-HCV NS3 polyclonal antibody (ab250686, Abbiotect) พบจุดโปรตีนที่มีสีเข้มในวันที่ 3 จากบางตัวอย่างและวันที่ 2 พบจุดโปรตีนที่ไม่จำเพาะจาก pcDNA3.1- vector control และเมื่อยืนยันความจำเพาะด้วย western blot กลับไม่พบแถบโปรตีนเป้าหมายที่มีขนาดประมาณ 74 kDa จากผลที่ได้ น่าจะเป็นเพราะ primary antibody ที่ใช้และวางจำหน่ายเป็น polyclonal antibody ที่จับจำเพาะต่อ common genotype ของ HCV เช่น g1a, g2a หรือ g2b ส่วน uncommon genotype จากงานวิจัยนี้ทั้ง g3a หรือ g6f ซึ่งมีลำดับ amino acid ที่แตกต่างจาก common genotype ถึง 75% แอนติบอดีจึงไม่สามารถจับและจับได้ ดังนั้นการทดสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี dot blot และ western blot ด้วย polyclonal antibody ที่จับจำเพาะต่อ common genotype ที่วางจำหน่ายอยู่จึงน่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสม จำเป็นต้องทดสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธีอื่น เช่น real-time PCR

จากผลการทดสอบด้วยวิธี real-time PCR พบว่า g3a ทั้ง 2 ตัวอย่างมีการแสดงออกของยีนได้สูงถึง 24-27 ล้านเท่า ส่วน g3a optimized codon มีการแสดงออกของยีนประมาณ 4 ล้านเท่า ส่วน g6f มีการแสดงออกได้น้อยกว่า g3a มาก เพียง g6f 2K เท่านั้นที่มีการแสดงออกได้ดีประมาณ 4 ล้านเท่า ส่วน g6f optimized codon มีการแสดงออกของยีนน้อยมาก ประมาณ 1000 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับ vector control จะเห็นได้ว่า wild-type nucleotide อาจสามารถแสดงออกของยีนในระดับสูงได้ และ optimization codon อาจไม่จำเป็นให้ผลในการเพิ่มการแสดงออกของยีนเสมอไป ที่เป็นเช่นนี้อาจขึ้นกับประสิทธิภาพของโปรแกรมในการ optimization codon และ optimized codon อาจไม่ได้สัมพันธ์โดยตรงการเพิ่ม immunogenicity ของแอนติเจนด้วย

สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นตอนต่อไป

NS3-NS4A gene ของ HCV g3a มีการแสดงออกของ NS3-NS4A ได้ดีกว่า HCV g6f โดยที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ wild-type codon มีการแสดงออกของยีนได้ กว่า optimized codon ทั้ง HCVg3a และ g6f

ข้อเสนอแนะสำหรับการทดสอบขั้นต่อไปควรผลิต polyclonal antibody ที่จำเพาะต่อ HCVg3a หรือ g6f เองด้วยนำแอนติเจนไปการกระตุ้นหนูหรือกระต่ายและนำแอนติบอดีที่ได้มาทดสอบด้วยวิธี western blot หรือใช้วิธีทดสอบด้วย in vitro transcription และ translation แล้วกำจัด nonspecific protein เพื่อลด background ก่อนแล้วทดสอบผลผลิตโปรตีนที่ได้ด้วยปฏิกิริยา non-radioactive translation systems แทนการใช้แอนติบอดีทดสอบเหมือนวิธี western blot เมื่อยืนยันผลการทดสอบได้แล้วควรนำ recombinant DNA ที่สามารถแสดงออกของยีนเป้าหมายได้ดีภายใน cell line ไปทดสอบ immunogenicity ต่อไป

ผลผลิต (Output)

Recombinant DNA ที่ประกอบด้วย NS3-NS4A gene ของ HCV g3a หรือ HCV g6f ที่มีการแสดงออกได้ดีใน HepG2 cell line และน่าจะพัฒนาเป็น DNA vaccine ถ้าสามารถพิสูจน์ได้ว่าสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อต้านการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบซีและนำตีพิมพ์ผลงานในวารสารต่างประเทศและนำไปยื่นจดสิทธิบัตรได้

เอกสารอ้างอิง (Reference)

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. Bartenschlager, R., Ahlborn-Laake, L., Mous, J., Jacobsen, H. 1993. Nonstructural protein 3 of the hepatitis C virus encodes a serine-type proteinase required for cleavage at the NS3/4 and NS4/5 junctions. *J. Virol.* 67: 3835-3844.
7. Bartenschlager, R., Lohmann, V., Wilkinson, T., Koch, J.O. 1995. Complex formation between the NS3A serine-type proteinase of the hepatitis C virus and NS4A and its importance for polyprotein maturation. *J. Virol.* 69: 7519-7528.
8. 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.
9. 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.
10. Degertekin, B. and Lok, A.S. 2007. Update on viral hepatitis. *Curr.Opin.Gastroenterol.* 24: 306-311.

11. Demi, L., Bojak, A., Steck, S., Wild, J., Schirmbeck, R., Wolf, H. et al. 2001. Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 gag protein. *J. Virol.* 75: 10991-11001.
12. Failla, C., Tomei, L., De Francesco, R. 1994. Both NS3 and NS4A are required for proteolysis processing of hepatitis C virus nonstructural proteins. *J. Virol.* 68: 3753-3760.
13. Fooladi, A.A.I., Bagherpour, G., Khoramabadi N., Mehrabadi, J.F., Mahdavi, M., Halabiam, R., Amin, M., Mobarakeh, J.I., and Einollahi, B. 2014. Cellular immunity survey against urinary tract infection using pVAX/*fimH* cassette with mammalian and wild type codon usage as a DNA vaccine. *Clin. Exp. Vaccine Res.* 3: 185-193.
14. 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.
15. 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.
16. Holmstrom, F., Tassetto, A., Nahr, V., Brass, A., Kriegs, M., Hildt, E., Broderick, K.E., Chen, M., Ahlen, G., and Frelin, L. 2013. A synthetic codon-optimized hepatitis C virus nonstructural 5A DNA vaccine primes polyfunctional CD8⁺ T cell responses in wild-type and NS5A-transgenic mice. *J. Immunol.* 190: 1113-1124.
17. 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.
18. 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.
19. Kao, J.H. and Chen, D.S. 2000. Transmission of hepatitis C virus in Asia: past and present perspectives. *J. Gastroenterol Hepatol* 15(Suppl): E91-E96.
20. Kutzler, M.A., Weiner, D.B. 2004. Developing DNA vaccines that call to dendritic cells. *J. Clin. Invest.* 114: 1241-1244.
21. Lao, W., Li, F.T., and Youde, P. 2001. Prevalence of genotype 6 chronic hepatitis C infection in Hong Kong. *Hepatology* 34: A689.
22. Lauer, G.M. and Walker, B.D. 2001. Hepatitis C virus infection. *N. Eng. J. Med.* 345: 41-52.

23. Lazdina, U. et al. 2001. Humoral and CD4(+) T helper (Th) cell responses to the hepatitis C virus non-structural 3 (NS3) protein: NS3 primes Th1-like responses more efficiently as a DNA-based immunogen than as a recombinant protein. *J. Gen Virol.* 82: 1299-1308.
24. 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.
25. 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.
26. Lorenz, F.K.M., Wilde, S., Voigt, K., Kieback, E., Mosetter, B., Schendel, D.J., and Uckert, W. 2015. Codon optimization of the human papillomavirus E7 oncogene induces a CD8⁺ T cell response to a cryptic epitope not harbored by wild-type-E7. *Plus One*, Doi: 10.1371/journal.pone.0121633. March 23, 2015.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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

31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. Nguyen, M.H., Trinh, H., Garcia, R.T. et. al. 2004. High prevalence of novel genotypes in Vietnamese patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 126: 2020A.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. Pang, P.S., Jankowsky, E., Planet, P.J., Pyle, A.M. 2002. The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding. *EMBO J.* 21: 1168-1176.
39. 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 Vietnam.AsianPacific. *J.Allergy Immunol.* 27: 153-160.
40. 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.
41. 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.

42. 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.
43. 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.
44. Simmonds P. 2004. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus-15 yearson. *J. Gen. Virol.* 3173-3188.
45. 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.
46. Spearman, P., Kalams, S., Elizaga, M. et. al. 2009. Safety and immunogenicity of a CTL multiepitope peptide vaccine for HIV with or without GM-CSF in a phase I trial. *Vaccine* 27: 243-249.
47. Sugiyama, K., Kato, N., Nakazawa, T. et al. 1995. Novel genotypes of hepatitis C virus in Thailand.*J. Gen. Virol.* 76: 2323-2327.
48. 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.
49. Tang, H. and Grise, H. 2009. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. *Clin. Sci.* 117: 49-65.
50. Tanji, Y. et al. 1995. Hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS4A has versatile functions in viral protein processing. *J virol.* 69: 1575-1581.
51. Theamboonlers, A., Chinchai, T., Bedi, K., Jantarasamee, P. Sripontong, M., Poovorawan, Y. 2002. Molecular characterization of hepatitis C virus (HCV) core region in HCV-infected Thai blood donor. *ActaVirologica* 46: 169-173.
52. 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.
53. 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.

54. Wang, S., Hackett, A., Jia, N., Zhang, C., Zhang, L., Parker, C. et al. Polyvalent DNA vaccines expressing HA antigens of H5N1 influenza viruses with an optimized leader sequence elicit cross-protective antibody responses. *PLoS One*. 2011 Jan; 6(12):e28757. Doi:10/1037/journal.pone.0028757 PMID: 22205966.
55. 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.
56. World Health Organization. Hepatitis C. fact Sheet (October 2000).<http://www/who/int/dated> 1/5/2005

ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล นางสาว อุไรวรรณ อินทมาโส
Miss Uraiwan Intamaso
2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน
3100903406954
3. ตำแหน่งปัจจุบัน
รองศาสตราจารย์
4. หน่วยงานที่สังกัด
สถานที่ติดต่อ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
169 ถ. ลงหาดบางแสน ต. แสนสุข อ. เมือง จ. ชลบุรี 20131
โทรศัพท์ 038-745900 ต่อ 3163 และ 081-4260754
โทรสาร 038-393497
E-mail uraiwani@buu.ac.th
5. ประวัติการศึกษา
วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยมหิดล ปี พ.ศ. 2535
วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยมหิดล ปี พ.ศ. 2538
Ph.D (Microbiology) Montana State University , USA, ปี ค.ศ. 2003
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
Molecular viology, immunology
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ
 - 7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี
 - 7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย
 - 7.2.1 เรื่อง “การพัฒนา peptide vaccineต่อต้านเชื้อไวรัสHIV” โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพา ปีงบประมาณ 2547
 - 7.2.2 เรื่อง “โครงการพัฒนารักษาการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสHIVโดย siRNA” โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณจาก สำนักงานคณะกรรมการ วิจัยแห่งชาติและสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ โครงการสนับสนุนทุนนักวิจัยใหม่ (วท.)2547

7.2.3 การตรวจสอบและพัฒนาชุดทดสอบการปนเปื้อนไวรัสตับอักเสบบีชนิด เอในหอยนางรม พื้นที่ชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณจากสำนักงานคณะกรรมการ วิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 2550-2551

7.2.4 การเลือกตอบสนองต่อ epitopes ของ hemagglutininของไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ในผู้ติดเชื้อ ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติปีงบประมาณ 2551

7.2.5 การพัฒนาวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนของไวรัสตับอักเสบบีชนิดเอในหอยนางรมที่เพาะเลี้ยงในพื้นที่ชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

7.2.6 การตรวจสอบการปนเปื้อนของไวรัสหลายชนิดพร้อมกันในหอยทะเลสดทุนอุดหนุนการวิจัยภายใต้โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษา ประจำปีงบประมาณพ.ศ.2556

7.2.7 วิธี duplex RT-PCR-Enzyme-Linked Immunoassay เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของไวรัสตับอักเสบบีชนิดเอและโรตาไวรัสพร้อมกันในหอยนางรมสดทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

7.2.8 การตรวจสอบสายพันธุ์และสายสกุลของโรตาไวรัสในผู้ป่วยเด็กที่มีอาการท้องเสียรุนแรงที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

7.2.9 การพัฒนาวัคซีนต่อต้านการติดเชื้อ nervous necrosis virus ในปลากะรัง ด้วยยีสต์อาร์ม มีงเทคโนโลยี ทุนอุดหนุนการวิจัยสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร(องค์การมหาชน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

7.2.10 การสร้างดีเอ็นเอวัคซีนต่อไวรัสตับอักเสบบีชนิดซีที่แพร่ระบาดในปัจจุบัน ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

7.2.11 การเปลี่ยนแปลงโคดอนเพื่อเพิ่มการแสดงออกของดีเอ็นเอวัคซีนต่อไวรัสตับอักเสบบีชนิดซีในเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากคน ทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

7.3.1 Intamaso U*, Poomipak W., Chutoam P., Chotchuang P., Sunkkham W., Srisopha S., Likanonsakul S. (2017). Genotype Distribution and Phylogenetic Analysis of Rotavirus in Thailand and Emergence of Uncommon Genotypes. Archives of clinical microbiology Vol 4 no 4:60:2017 Doi 14.4172/1898-8436.100060

7.3.2 Pomwised, R., Intamaso, U., Teintze, M., Young, M., &Pincus, S. H. (2016). Coupling Peptide Antigens to Virus-Like Particles or to Protein Carriers Influences the Th1/Th2 Polarity of the Resulting Immune Response. Vaccine (Basel). May 5;4(2). pii: E15. doi: 10.3390/vaccines4020015

7.3.3 Intamaso, U*, Boonbanjong, P., Wisunthorn, S., Ong-in, N., Keawpo, B. &Poomipak, W. (2015). Detection by Duplex RT-coupled Nested PCR of Hepatitis A and Rotavirus in Oysters from Thailand East Coast. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 46(4), 624-639.

7.3.4 Intamaso, U*, &Ketkhunthod, S. (2014). Evaluation of a Sensitive Reverse-Transcription PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Hepatitis A Virus in Oysters (*Saccostreaglomerata*) on the East Coast of the Gulf of Thailand. Journal of Food Protection, 77(5), 859-863.

7.3.5 Intamaso, U*. &Withaya, P. (2011). Rapid detection of hepatitis A viruses in the eastern coast of Thailand. J. Science Technology and Humanities, 9, 9-17.

7.3.6 Intamaso, U*, Chaiyasanit, P., Tangwattanachuleeporn, M., Pantuwatana, S. (2009). Suppression of endogenous hRIP gene expression by miRNA in HeLa and 293T cells. J. Science Technology and Humanities, 7, 1-10.

7.3.7 Intamaso,U*, Imloinou, P.,Nopparat, C., and Sudsamai, J. (2005). Expression and Purification of 6xHis-tagged fusion proteins derived from random peptide phage display in Escherichia Coli. Journal of Sciences, Technologies and Humanities, 3, 77-85.

7.3.8 รายงานฉบับสมบูรณ์เรื่องการเลือกตอบสนองต่อ epitopes ของ hemagglutininของไวรัสไข้หวัดนก H5N1 ในผู้ติดเชื้อ

ประวัติผู้ร่วมโครงการวิจัย

รายละเอียดการเขียนประวัติส่วนตัว

CURRICULUM VITAE

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-นามสกุล (ไทย/ อังกฤษ) นายปลาธิป ชูท้วม

Mr.Palatip Chutoam

ที่อยู่ปัจจุบัน.....78 หมู่ 12 ตำบลตำนาน อำเภอเมือง จังหวัดพัทลุง 93000.....

ประวัติการศึกษา

ปี พ.ศ.ที่จบ	คุณวุฒิ	สาขาวิชา	สถานศึกษา
2557	ปร.ด.	ชีวเคมี	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
2550	วท.บ.	เทคนิคการแพทย์	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ประวัติการทำงาน/ ผลงาน

ปี พ.ศ.	ตำแหน่ง	สถานที่ทำงาน
2559-ปัจจุบัน	อาจารย์	คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
2557-2559	อาจารย์	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเวสเทิร์น

ตำแหน่งปัจจุบัน/ สถานที่ทำงาน

.....อาจารย์ /คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา 169 ถนนลงหาดบางแสน ตำบลแสนสุข อำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี 20131.....

สาขาที่มีความชำนาญ.....Molecular biology, Proteomics, Biochemistry.....

ผลงานทางวิชาการ

- ประเภทบทความ

Intamaso U., Poomipak W., Chutoam P., Chotchuang P., Sunkkham W., Srisopha S., Likanonsakul S. (2017). Genotype Distribution and Phylogenetic Analysis of Rotavirus in Thailand and Emergence of Uncommon Genotypes. Archives of clinical microbiology Vol 4 no 4:60:2017 Doi 14.4172/1898-8436.100060

Chutoam, P., Charoensawan, V., Wongtrakoongate, P., Kum-Arth, A., Buphamalai, P., & Tungpradabkul, S. (2013). RpoS and oxidative stress conditions regulate succinyl-CoA: 3-ketoacid-coenzyme A transferase (SCOT) expression in Burkholderia pseudomallei. Microbiology and Immunology, 57(9), 605-615. doi: 10.1111/1348-0421.12077

Chutoam, P., Klongthalay, S., & Somsak, V. (2015). Effect of Crude Leaf Extract of *Bauhinia strychnifolia* in BALB/c Mice Infected with *Plasmodium berghei*. *Malaria Control & Elimination*, 1-5. doi: 10.4172/2470-6965.1000S1-002

Muangpruan, P., Janruengsri, T., Chutoam, P., Klongthalay, S., Somsak, & Voravuth. (2015). Protective effects of *Andrographis paniculata* leaf extract on liver and renal damage and hypoglycemia during *Plasmodium berghei* infection. *Malaria Control & Elimination*, 2015. doi: 10.4172/1000135

Nutham, N., Sakulmettatham, S., Klongthalay, S., Chutoam, P., & Somsak, V. (2015). Protective Effects of *Tinospora crispa* Stem Extract on Renal Damage and Hemolysis during *Plasmodium berghei* Infection in Mice. *Journal of Pathogens*, 2015, e738608. doi: 10.1155/2015/738608

Sihabud, M., Yongthawee, P., Chutoam, P., Somsak, S. K., & Voravuth. (2015). Effect of Black Tea Extract on Hypoglycemia Induced by *Plasmodium berghei* ANKA Infection in Mice. *Malaria Control & Elimination*, 2015. doi: 10.4172/ MCE.1000S1-005

1. ชื่อ-นามสกุล นางสาวกนกพร ศรีสุจริตพานิช
Miss Kanokporn Srisucharitpanit
2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน
3102300470211
3. ตำแหน่งปัจจุบัน
อาจารย์
4. หน่วยงานที่สังกัด
สถานที่ติดต่อ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
169 ถ. ลาดยาวบางแสน ต. แสนสุข อ. เมือง จ. ชลบุรี 20131
โทรศัพท์ 038-103169 และ 089-8943838
โทรสาร 038-393497
E-mail kanokporn@buu.ac.th
5. ประวัติการศึกษา
วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปีพ.ศ. 2549
ปร.ด. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์) มหาวิทยาลัยมหิดล ปีพ.ศ. 2556
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
Molecular biology, Protein engineering
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ
 - 7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ไม่มี
 - 7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ไม่มี
 - 7.3 งานวิจัยที่ทำแล้วเสร็จ:
 1. **Srisucharitpanit K**, Inhana P, Rungrod A, Promdonkoy B & Boonserm P (2012) Expression and purification of the active soluble form of *Bacillus sphaericus* binary toxin for structural analysis. **Protein Expr Purif**82: 368-372.
 2. **Srisucharitpanit K**, Yao M, Chimnaronk S, Promdonkoy B, Tanaka I & Boonserm P (2013) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the functional form of BinB binary toxin from *Bacillus sphaericus*. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun**69: 170-173.

1. ชื่อ-นามสกุล นายวิทยา ภูมิภักดิ์
Mr. Witthaya Poomipak

2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน
1 7299 00060 78 6

3. ตำแหน่งปัจจุบัน
นักวิทยาศาสตร์

4. หน่วยงานที่สังกัด ฝ่ายวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
สถานที่ติดต่อ ห้องปฏิบัติการนรีเวชชีวภาพระดับ 3 ตึก อปร.ชั้น 9
โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ถ.พระราม 4 กรุงเทพฯ 10330
โทรศัพท์ 087-148-3068, 02-256-4000 ต่อ 3599
โทรสาร 02-652-4204
E-mail Nucler_13@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การแพทย์) มหาวิทยาลัยบูรพา
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมีทางการแพทย์) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
จุลชีววิทยา, Bioinformatic

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : -

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :

WitthayaPoomipak, PiyathidaPongsiri, JarikaMakkoch, Yong Poovorawan, SunchaiPayungporn.
Molecular detection and subtyping of human influenza A viruses based on multiplex RT-PCR
assay. International Research Journal of Biotechnology (ISSN: 2141-5153) Vol. 2(5) pp.085-092,
May, 2011

7.3 งานวิจัยที่ทำแล้วเสร็จ :

WitthayaPoomipak, PiyathidaPongsiri, JarikaMakkoch, Yong Poovorawan, SunchaiPayungporn.
Molecular detection and subtyping of human influenza A viruses based on multiplex RT-
PCR assay. International Research Journal of Biotechnology (ISSN: 2141-5153) Vol. 2(5)
pp.085-092, May, 2011

- Sunchai Payungporn, WittayaPoomipak, PornpimolRianthavorn, Apiradeetheamboonlers, JarikaMakkoch, Yong poovorawan. Detection of oseltamivir sensitive/resistant strains of pandemic influenza A virus (H1N1) from patients admitted to hospitals in Thailand. *Journal of virological methods* 2011; 177(2):133-9.
- Uraivan Intamaso, Witthaya Poomipak. Rapid detection of Hepatitis A virus on oysters in the east coast of Thailand. *Journal of science, technology, and humanities* Vol. 9 No. 1 (2011)p. 9-17.
- Intamaso U., Boonbanjong P., Wisunthorn S., Ong-in N., Keawpo B. and Poomipak W. Detection by duplex RT-coupled Nested PCR of Hepatitis A and Rotavirus in Oysters from Thailand East Coast. *South East Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 2015, 4: 625-639 .