ว กรมวิทย พ 2567; 66 (2): 272-284

# การผลิต Pseudovirion ของ HPV สายพันธุ์ 16 เพื่อการพัฒนาวิธี Pseudovirion-Based Neutralization Assay (PBNA)

**วิภาวี วงศ์ชนะ[1] สกาลิน ไตรศิริวาณิชย์[1] และ สุภาพร ภูมิอมร[2]**

*[1]สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000*

*[2]สำนักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นนทบุรี 11000*

**บทคัดย่อ** การติดเชื้อ human papillomavirus (HPV) มีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งปากมดลูก มาตรการในการลดความเสี่ยง คือ การฉีดวัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อ HPV ทั้งนี้วิธี pseudovirion-based neutralization assay (PBNA) ถูกนำมาใช้ในการทดสอบระดับ neutralizing antibody ในผู้รับวัคซีน บทความนี้รายงานการผลิต pseudovirion สายพันธุ์ 16 (HPV-16 pseudovirion) ซึ่งได้รับการถ่ายทอดวิธีการจาก National Institutes for Food and Drug Control (NIFDC) สาธารณรัฐประชาชนจีน โดยพบว่าหลังเหนี่ยวนำพลาสมิด p16sheLL และ pcDNA3.1 eGFP เข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT สามารถผลิต pseudovirion ที่มีโปรตีนเรืองแสง eGFP ได้ภายใน 48 ชั่วโมง และสามารถติดเชื้อเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ได้ เมื่อนับเซลล์เรืองแสงด้วยเครื่อง ELSPOT จะได้ระดับไตเตอร์ของ pseudovirion ที่ทำให้เซลล์เรืองแสง 300 เซลล์ ต่อ 0.1 มิลลิลิตร เป็น 4.37 คำนวณค่าความเจือจางที่สามารถนำไปใช้ในการทดสอบ PBNA ได้เท่ากับ 11,771 เท่า และมีระดับไตเตอร์ที่ทำให้ร้อยละ 50 ของเซลล์มีการติดเชื้อ ($TCID_{50}$) ต่อ 0.1 มิลลิลิตร เป็น 6.67 คำนวณค่าความเจือจางที่สามารถใช้ในการทดสอบ PBNA เป็น 11,585 เท่า สรุปว่าวิธีนี้สามารถนำมาใช้ในการผลิต HPV-16 pseudovirion ที่สามารถทำให้เซลล์ติดเชื้อและคำนวณค่าไตเตอร์ได้ การผลิต HPV-16 pseudovirion จึงเป็นต้นแบบในการผลิต pseudovirion ของ HPV สายพันธุ์อื่น รวมทั้งใช้ถ่ายทอดองค์ความรู้ให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการผลิตและพัฒนาวัคซีนป้องกันมะเร็งปากมดลูกต่อไป

**คำสำคัญ:** การผลิต pseudovirion ของ HPV สายพันธุ์ 16 , การเหนี่ยวนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์, Pseudovirion-based neutralization assay (PBNA)

*Corresponding author E-mail: wipawee.w@dmsc.mail.go.th*

*Received: 26 July 2023* *Revised: 27 March 2024* *Accepted: 24 April 2024*

## บทนำ

human papillomavirus (HPV) เป็นไวรัสที่ไม่มีเปลือกหุ้ม (non-enveloped virus) มีสารพันธุกรรมชนิด DNA อยู่ภายในโปรตีนห่อหุ้ม (capsid protein) ซึ่งประกอบด้วย โปรตีน L1 เป็น major capsid protein มีปริมาณร้อยละ 80 ของปริมาณโปรตีนทั้งหมด และโปรตีน L2 เป็น minor capsid protein ซึ่งมีบทบาทในการทำให้เซลล์เกิดการติดเชื้อ โดยโปรตีน L1 และ L2 ทำหน้าที่ร่วมกันในการห่อหุ้ม (encapsidate) สารพันธุกรรมของไวรัสไว้[1] มีงานวิจัยพบว่าอุบัติการณ์เกิดมะเร็งหลายชนิดสัมพันธ์กับการติดเชื้อ HPV เช่น มะเร็งปากมดลูกและมะเร็งปากช่องคลอด เป็นต้น[2] เชื้อ HPV มีมากกว่า 200 สายพันธุ์ เป็นกลุ่ม high risk ที่สัมพันธ์กับมะเร็งปากมดลูก 14 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 66, 68 และ 70 และกลุ่ม low risk ซึ่งสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งปากมดลูกต่ำ เช่น สายพันธุ์ 6, 11, 42, 43 และ 44[2,3] ปัจจุบันการเฝ้าระวังมะเร็งปากมดลูกใช้การตรวจคัดกรองการติดเชื้อ HPV บริเวณปากมดลูก และการป้องกันโดยการฉีดวัคซีน[4]

มีงานวิจัยพบว่าโปรตีน L1 สามารถประกอบตัวเอง (self-assemble) เป็นอนุภาคคล้ายไวรัส (virus-like particles; VLPs) ได้[1,5] ซึ่ง VLPs มีโครงสร้างเหมือนกับเชื้อ HPV ต้นแบบและสามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ HPV ทำให้มีการพัฒนาการผลิตวัคซีนชนิด VLPs สำหรับป้องกันมะเร็งปากมดลูกขึ้น เมื่อฉีดวัคซีนดังกล่าวเข้ากล้ามเนื้อ จะสามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้าง neutralizing antibody ต่อเชื้อ HPV สายพันธุ์ที่นำมาผลิตวัคซีนได้[5] ปัจจุบันทั่วโลกมีวัคซีนมะเร็งปากมดลูกชนิด VLPs 3 แบบ ได้แก่ แบบ 2 สายพันธุ์ คือ 16 และ 18 แบบ 4 สายพันธุ์ คือ 6, 11, 16 และ 18 และแบบ 9 สายพันธุ์ คือ 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 และ 58[6]

การติดตามผลหลังจากการฉีดวัคซีนมะเร็งปากมดลูก จำเป็นต้องมีการประเมินการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะการวิเคราะห์ neutralizing antibody แต่เนื่องจากเชื้อ HPV ไม่สามารถเพาะเลี้ยงในเซลล์เพาะเลี้ยงได้[7,8] ทำให้ไม่สามารถใช้วิธีการตรวจ neutralizing antibody ที่ใช้ไวรัสจริง จึงมีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ antibody-mediated neutralization ที่ไม่ใช้ไวรัสจริงขึ้นหลายวิธี[9] วิธีที่นิยมคือ pseudovirion-based neutralization assay (PBNA) ที่สามารถประยุกต์เข้ากับเครื่องมือชนิด high-throughput ในการตรวจ neutralizing antibody ต่อหลายสายพันธุ์ได้พร้อม ๆ กัน[10-12] โดยใช้ pseudovirion ของแต่ละสายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของโปรตีนติดตาม (reporter protein) เพื่อบ่งชี้ความสามารถการติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ [13-15]

สถาบันชีววัตถุ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันวัคซีนแห่งชาติเพื่อรับการถ่ายทอดเทคโนโลยีจาก National Institutes for Food and Drug Control (NIFDC) สาธารณรัฐประชาชนจีน ในการผลิต HPV-16 pseudovirion สำหรับนำมาใช้ในการทดสอบ neutralizing antibody โดยวิธี PBNA[13,14] HPV-pseudovirion เตรียมได้จากการเหนี่ยวนำ packaging plasmid ชนิด p16sheLL ที่มีชิ้นส่วนยีน capsid ได้แก่ L1 และ L2 ของเชื้อ HPV สายพันธุ์ 16 และ reporter plasmid ชนิด pCDNA3.1 eGFP ที่มีชิ้นส่วนยีนโปรตีนเรืองแสง ในพลาสมิด pcDNA3.1 vector เข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง[10] ทั้งนี้ HPV-pseudovirion ที่ได้มีคุณสมบัติทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงติดเชื้อเหมือน HPV ตามธรรมชาติแต่ไม่สามารถก่อโรค เนื่องจากไม่มีองค์ประกอบสารพันธุกรรมที่เป็นจีโนมของไวรัส เมื่อนำซีรัมของผู้ที่ได้รับวัคซีนป้องกันมะเร็งปากมดลูกที่ระดับเจือจางต่าง ๆ (titer) มาบ่มกับ pseudovirion จะสามารถหาระดับของ neutralizing antibody ที่ทำให้ pseudovirion หมดความสามารถในการติดเชื้อในเซลล์เพาะเลี้ยงได้

บทความนี้เป็นรายงานการผลิต HPV-16 pseudovirion และการวิเคราะห์ระดับไตเตอร์ของ pseudovirion ตามวิธีที่ได้รับการถ่ายทอดเทคโนโลยี ที่แสดงถึงความสำเร็จในการผลิต HPV-16 pseudovirion สามารถใช้วิธีการนี้เป็นต้นแบบสำหรับการนำไปสู่การขยายผลเพื่อผลิต HPV-pseudovirion สายพันธุ์อื่น และถ่ายทอดองค์ความรู้ให้ผู้ผลิตในประเทศหรือนักวิจัยสำหรับสนับสนุนงานวิจัยและรองรับการผลิตวัคซีนมะเร็งปากมดลูกภายในประเทศไทยได้ต่อไป

## วัสดุและวิธีการ

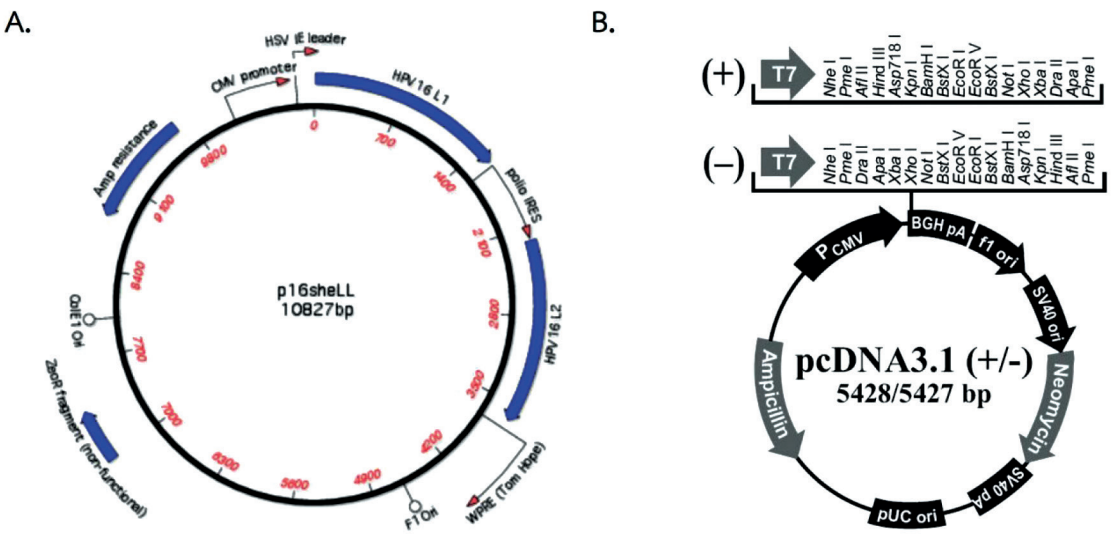
**เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT และอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์**

เพาะเลี้ยงเซลล์ 293FT (Invitrogen, USA) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM high/glucose (Gibco, USA) ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine Serum (FBS) (Gibco, USA) 1% non-essential amino acid (NEAA) (Gibco, USA) 1% penicillin/streptomycin (Gibco, USA) และ 2% HEPES (Gibco, USA) ในการทำให้เซลล์หลุดลอกจากภาชนะเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนหรือนำไปใช้กระบวนการผลิต HPV pseudovirion ใช้ 0.05% trypsin-EDTA (Gibco, USA) และ phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco, USA)

**พลาสมิด (plasmid)**

packaging plasmid (p16sheLL) มีชิ้นส่วนยีน *HPV16-L1/L2* (ID. No. 37320, Addgene, USA) reporter plasmid (pcDNA3.1 eGFP) ขนาด 6,148 bp.[10] มียีนของโปรตีนเรืองแสง enhanced green fluorescence protein (*EGFP* gene) แทรกใน pcDNA3.1 vector โดย reporter plasmid ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยงาน NIFDC สาธารณรัฐประชาชนจีน (NIFDC, China)

การเพิ่มจำนวนพลาสมิดทำโดยการนำพลาสมิดเข้าสู่ *E.coli* TOP10 competent cells (Thermo-Fisher Scientific, USA) นำโคโลนีแบคทีเรียที่ได้มาสกัดพลาสมิดด้วยชุด QIAprep Miniprep (Qiagen) และตรวจสอบลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน *HPV16L1* ที่บรรจุอยู่ในพลาสมิด ด้วย BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Thermo Fisher Scientific, USA) โดยใช้ CMV promoter primer และวิเคราะห์ผลโดยเครื่อง ABI PRISM® 3500xL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, USA)[16] ข้อมูลที่ได้ถูกนำมาเทียบกับข้อมูลของพลาสมิดที่ได้จากผู้ผลิต




**ภาพที่ 1** โครงสร้างพลาสมิดที่ใช้ในการผลิต HPV-16 pseudovirion
(A) packaging plasmid (*HPV16-L1/L2*) และ (B) pcDNA3.1 vector

**สารเคมีและสารละลาย**

OptiMEM (Invitrogen, USA) Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) และ Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (Hyclone, USA) ใช้ในการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์

benzonase nuclease (Sigma, USA) และ plasmid safe ATP-dependent DNase (Epicentre, USA) 1M $(NH_4)_2SO_4$ เตรียมโดยเติม 1.3 กรัม $(NH_4)_2SO_4$ (Sigma, USA) ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร 5M NaCl เตรียมโดยเติม 14.6 กรัม NaCl (Sigma, USA)

ในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร 10% Triton ×-100 เตรียมโดยเติม 1.0 มิลลิลิตร Triton ×-100 (Sigma, USA) ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร (ใช้ในกระบวนการ maturation)

**การนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ด้วยกระบวนการ transfection**

เพาะเลี้ยงเซลล์ 293FT ความเข้มข้น $4\times10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ 293FT ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้อบเพาะเชื้อชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ (รุ่น NU-5510E, NUAIRE, UK) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ให้เซลล์มีความหนาแน่น 40-50% จากนั้นเหนี่ยวนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ โดยก่อนครบเวลา 18 ชั่วโมง เตรียมส่วนผสมในหลอดหมุนเหวี่ยงพลาสติกปราศจากเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด หลอดที่ 1 เติม OptiMEM 1.5 มิลลิลิตร พลาสมิด p16sheLL และพลาสมิด pcDNA3.1 eGFP อย่างละ 12 ไมโครกรัม หลอดที่ 2 เติม OptiMEM 1.5 มิลลิลิตร และ Lipofectamine 2000 ปริมาตร 60 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มส่วนผสมที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาให้เติมส่วนผสมจากหลอดที่ 1 ลงในหลอดที่ 2 ทีละหยดให้หมด และบ่มต่อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลาเติมสารผสมที่ได้ลงในเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ที่เตรียมไว้ บ่มเซลล์เพาะเลี้ยงดังกล่าวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลล์เซียส ในตู้อบเพาะเชื้อชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออกและเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ 15 มิลลิลิตร แล้วบ่มต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนต์ (รุ่น IAXIO, ZIESS, Germany) ที่กำลังขยาย 5X โดยพิจารณาเซลล์ที่เรืองแสง eGFP ภายใต้ fluorescence (FITC) และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ด้วย brightfield (BF)

**การเก็บเกี่ยวเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ที่มี HPV-16 pseudovirion และทำ maturation**

ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมดโดยระวังไม่ให้กระทบกับเซลล์ เติม DPBS 10 มิลลิลิตร และดูดขึ้น-ลงเบา ๆ เพื่อให้เซลล์ที่เกาะอยู่หลุดจากภาชนะเพาะเลี้ยงให้ได้เซลล์แขวนลอย ย้ายเซลล์ในของเหลวใส่หลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงแบบควบคุมอุณหภูมิ (รุ่น CAX-370, TOMY, JAPAN) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 210 g อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งเหลือตะกอนเซลล์มีปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติม DPBS 1.0 มิลลิลิตร แล้วดูดตะกอนเซลล์ใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 2.0 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 210 g อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ปรับตะกอนเซลล์ให้มีปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติม DPBS ปริมาตร 195 ไมโครลิตร ตามด้วย 1M $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาตร 12.6 ไมโครลิตร 10% Triton ×-100 ปริมาตร 25.2 ไมโครลิตร ATP buffer ปริมาตร 20.2 ไมโครลิตร benzonase nuclease buffer ปริมาตร 50.4 ไมโครลิตร benzonase nuclease และ plasmid safe ATP-dependent DNase อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร ได้ปริมาตรสุทธิ 504.4 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้อบเพาะเชื้อชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำ immature HPV-16 pseudovirion ที่ได้แช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที เติม 5M NaCl ปริมาตร 86 ไมโครลิตร (0.17 เท่าของปริมาตรทั้งหมด) บ่มในน้ำแข็งต่อ เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 g เป็นเวลา 5 นาที เก็บเฉพาะส่วนใส ซึ่งเป็น mature HPV-16 แบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 ไมโครลิตร หลอดละ 25-30 ไมโครลิตร และเก็บที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (FORMA™, Thermo Scientific, USA)

**การตรวจหาไตเตอร์ของ HPV-16 pseudovirion**

เติมเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ที่ความเข้มข้น $1.5\times10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในเพลทเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม จำนวน 2 เพลท บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้อบเพาะเชื้อชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนครบเวลาให้เตรียมเพลทเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม สำหรับการเจือจาง pseudodivrion จำนวน 2 เพลท เติมอาหารสำหรับ

เพาะเลี้ยงเซลล์ 293FT ปริมาตร 120 ไมโครลิตรต่อหลุม ในทุกหลุม จากนั้นนำ mature HPV-16 pseudovirion ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ออกมาละลายในน้ำแข็งและเจือจางด้วยอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ 293FT ที่อัตราส่วน 1/100 ในหลอดขนาด 1.5 ไมโครลิตร เติม HPV-16 pseudovirion ที่เจือจางไว้ลงในคอลัมน์ที่ 2 แถว B-G (6 หลุม) ปริมาตร 120 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วเจือจางต่อแบบ serial 2-fold dilution ในเพลทที่เตรียมไว้สำหรับเจือจางให้ครบ 2 เพลท ตามแนวคอลัมน์ จะได้ HPV-16 pseudovirion ที่มีค่าการเจือจางตั้งแต่ 1/200 ถึง 1/104,857,600 เท่า นำมาเติมลงในเพลทที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT บ่มครบ 4 ชั่วโมง ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยเว้นการเติม HPV-16 pseudoviron ในคอลัมน์ 1 และ 12 รวมถึงในแถว A และ H เพื่อป้องกันการอ่านผลผิดพลาดจากการระเหยของอาหารเลี้ยงเซลล์ระหว่างการบ่ม จากนั้นบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศเซลเซียส ในตู้อบเพาะเชื้อชนิดคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์เรืองแสงในแต่ละระดับความเจือจางด้วยโปรแกรม ImmunoSpot 7.0.23.2

**การคำนวณค่าไตเตอร์ของ HPV-16 pseudovirion**

ตามคำแนะนำของ NIFDC กำหนดให้จำนวนเซลล์เรืองแสงที่ 300 เซลล์ ต้องมีค่าไตเตอร์มากกว่า 3.0 จึงเหมาะสมต่อการใช้ทดสอบ PBNA[13] ทำการนับจำนวนเซลล์เรืองแสงในแต่ละระดับความเจือจาง ด้วยโปรแกรม ImmunoSpot 7.0.23.2 ที่ติดตั้งในเครื่องอ่าน ELISPOT (CTL ImmunoSpot®, OH, USA) จากนั้นหาความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างค่า log ของจำนวนเซลล์เรืองแสงที่ได้กับค่า log ของระดับความเจือจาง นำสมการที่ได้จากความสัมพันธ์เชิงเส้นมาหาค่าความเจือจางหรือไตเตอร์ที่ทำให้ได้จำนวนเซลล์เรืองแสง 300 เซลล์ โดยการแทนค่า X ในสมการด้วย log 300 ทั้งนี้ค่าไตเตอร์ที่ได้จากการคำนวณด้วยสมการเชิงเส้นนี้มีหน่วยเป็น log ของเซลล์เรืองแสงที่ 300 เซลล์/0.1 มิลลิลิตร [(log 300 เซลล์)/0.1 มิลลิลิตร] การหาค่าไตเตอร์ของ HPV-16 pseudovirion สามารถคำนวณได้ด้วยวิธี Reed-Muench[10] โดยหาค่าความเจือจางหรือไตเตอร์ที่ทำให้เซลล์เรืองแสงร้อยละ 50 ($logTCID_{50}$/0.1 มิลลิลิตร) นำข้อมูลที่ได้จากโปรแกรม ImmunoSpot 7.0.23.2 มานับจำนวนหลุมของแต่ละความเจือจางที่มีจำนวนเซลล์เรืองแสงมากกว่าหรือเท่ากับ 3 เซลล์ เป็นหลุมที่ให้ผลบวก และน้อยกว่า 3 เซลล์ เป็นหลุมที่ให้ผลลบ หาค่าผลรวมสะสมของหลุมที่ให้ค่าเป็นบวก (sum of positive number; SP) ผลรวมสะสมของหลุมที่ให้ค่าเป็นลบ (sum of negative number; SN) ดังแสดงในตารางที่ 1 และหาค่า upper 0.5 และ lower 0.5 จากค่าคำนวณด้วยสูตร SP/(SP+SN) จากนั้นคำนวณโดยใช้สูตร

$A = (\text{upper } 0.5 - 0.5)/(\text{upper } 0.5 - \text{lower } 0.5)$,

$\text{LogTCID}_{50}/0.1 \text{ มิลลิลิตร} = \log(\text{dilution}) + A \times \log(2)$

**ตารางที่ 1** จำนวนเซลล์ที่มีเรืองแสงในแต่หลุมทดสอบและนับด้วยเครื่อง ELISPOT โดยโปรแกรม ImmunoSpot 7.0.23.2 เพื่อใช้ในการหาค่าไตเตอร์ของ HPV-16 pseudovirion

| เพลทที่ 1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1/200 | 1/400 | 1/800 | 1/1,600 | 1/3,200 | 1/6,400 | 1/12,800 | 1/25,600 | 1/51,200 | 1/120,400 | |
| A | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| B | -1 | 1,360 | 1,841 | 1,753 | 1,789 | 1,653 | 1,131 | 656 | 271 | 141 | 62 | -1 |
| C | -1 | 1,287 | 1,530 | 1,664 | 1,501 | 1,533 | 1,069 | 579 | 233 | 120 | 67 | -1 |
| D | -1 | 1,298 | 1,567 | 1,666 | 1,633 | 1,543 | 1,212 | 605 | 255 | 91 | 61 | -1 |
| E | -1 | 1,258 | 1,555 | 1,670 | 1,799 | 1,586 | 1,273 | 467 | 122 | 113 | 56 | -1 |
| F | -1 | 1,290 | 1,586 | 1,836 | 1,934 | 1,764 | 1,241 | 660 | 261 | 89 | 68 | -1 |
| G | -1 | 1,353 | 1,686 | 1,870 | 1,975 | 1,842 | 1,321 | 673 | 307 | 130 | 76 | -1 |
| H | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 |

6 ซ้ำ

**ตารางที่ 1** จำนวนเซลล์ที่มีเรืองแสงในแต่หลุมทดสอบและนับด้วยเครื่อง ELISPOT โดยโปรแกรม ImmunoSpot 7.0.23.2 เพื่อใช้ในการหาค่าไตเตอร์ของ HPV-16 pseudovirion (ต่อ)

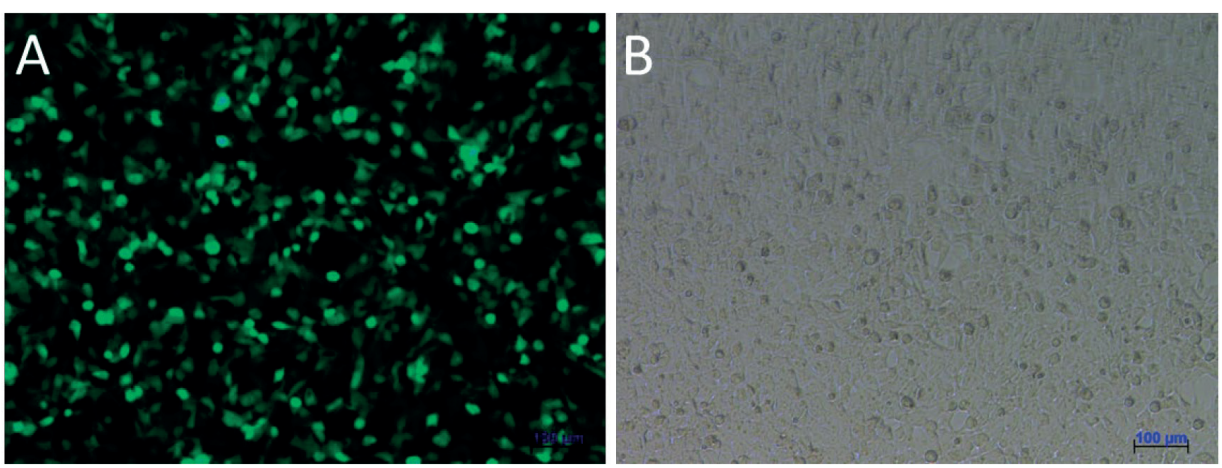
| | เพลทที่ 2 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1/200 | 1/400 | 1/800 | 1/1,600 | 1/3,200 | 1/6,400 | 1/12,800 | 1/25,600 | 1/51,200 | 1/120,400 | |
| 6 ช้า ↓ | A | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| | B | -1 | 45 | 21 | 10 | 3 | 5 | 3 | 2 | 1 | 1 | 3 | -1 |
| | C | -1 | 43 | 11 | 12 | 6 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | -1 |
| | D | -1 | 33 | 9 | 11 | 3 | 5 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | -1 |
| | E | -1 | 34 | 9 | 4 | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | -1 |
| | F | -1 | 44 | 18 | 12 | 6 | 3 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | -1 |
| | G | -1 | 45 | 19 | 10 | 9 | 4 | 3 | 1 | 1 | 0 | 1 | -1 |
| | H | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 |

นอกจากค่าไตเตอร์แล้ว สามารถคำนวณค่าเจือจาง (dilution fold) ของ pseudovirion ที่ผลิตได้ เพื่อนำไปใช้ทดสอบ PBNA โดยการคำนวณจากค่าไตเตอร์ต่อปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากการเรืองแสง 300 เซลล์ [(300 เซลล์)/0.05 มิลลิลิตร] หรือคำนวณจาก 200 เท่าของ $TCID_{50}$ ที่ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ($200TCID_{50}$/0.05 มิลลิลิตร) ซึ่งเป็นค่าที่หน่วยงาน NIFDC สาธารณรัฐประชาชนจีน ศึกษาและใช้ในการทดสอบวิธี PBNA เพื่อวิเคราะห์ protective titer ของวัคซีน HPV ที่มีการใช้ในสาธารณรัฐประชาชนจีน[10]

## ผล

### การนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ด้วยกระบวนการ transfection

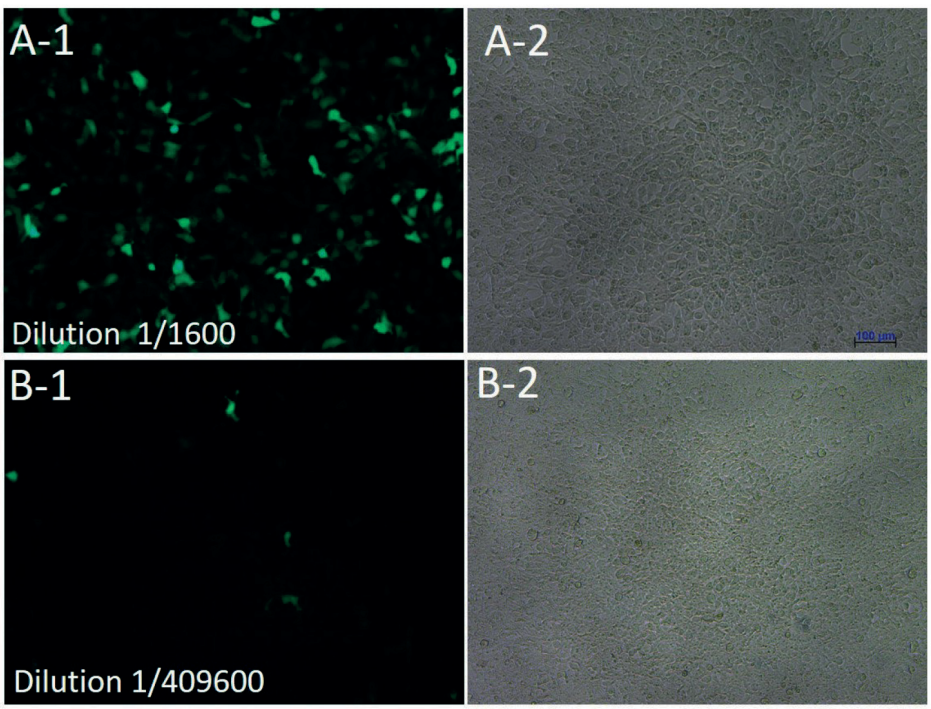
หลังนำ packaging plasmid สำหรับผลิต HPV-16 pseudovirion และ reporter plasmid เข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT เมื่อครบเวลา 48 ชั่วโมง นำมาตรวจติดตามการแสดงออกของโปรตีนเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์จาก eGFP ในเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนต์ พบเซลล์เรืองแสง ดังแสดงในภาพที่ 2




**ภาพที่ 2** เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT หลังถูกเหนี่ยวนำด้วย packaging plasmid (*HPV16-L1/L2*) และ reporter plasmid (eGFP) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ ภายใต้ (A) fluorescence (FITC) และ (B) brightfield (BF) ที่กำลังขยายเลนส์วัตถุ 5X

**HPV-16 pseudovirion ที่ผลิตได้สามารถทำให้เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ติดเชื้อ**

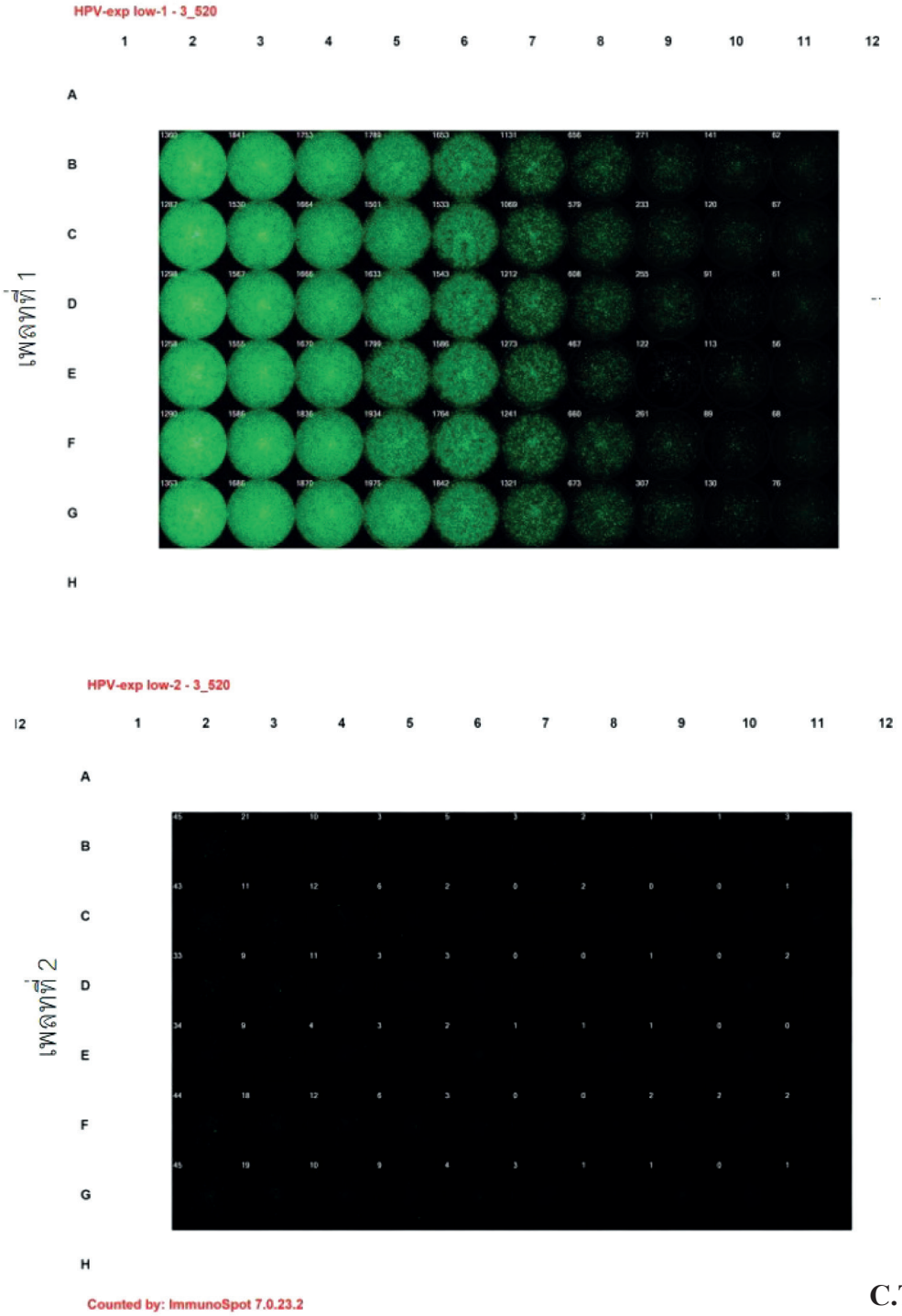
หลังจากนำ HPV-16 pseudovirion ที่เจือจางแบบ serial 2-fold dilution ตั้งแต่ 1/200 ถึง 1/104,857,600 เท่า มาเติมลงในเซลล์ 293FT โดยไม่มีการเติมน้ำยาสำหรับการ transfection พบว่า pseudovirion ที่ผลิตได้สามารถทำให้เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT เรืองแสง ซึ่งเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT เรืองแสงจะมีจำนวนลดน้อยลงเมื่อมีค่าการเจือจางของ pseudovirion เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นถึงสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์เรืองแสงกับปริมาณ pseudovirion ตัวอย่างเซลล์เรืองแสงที่ความเจือจางต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 3 เมื่อตรวจติดตามการแสดงออกของ eGFP ในเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนต์ที่เวลา 72 ชั่วโมง เป็นการพิสูจน์ได้ว่ากระบวนการผลิต HPV-16 pseudovirion มีสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต HPV-pseudovirion ที่มีความสามารถในการทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงติดเชื้อได้



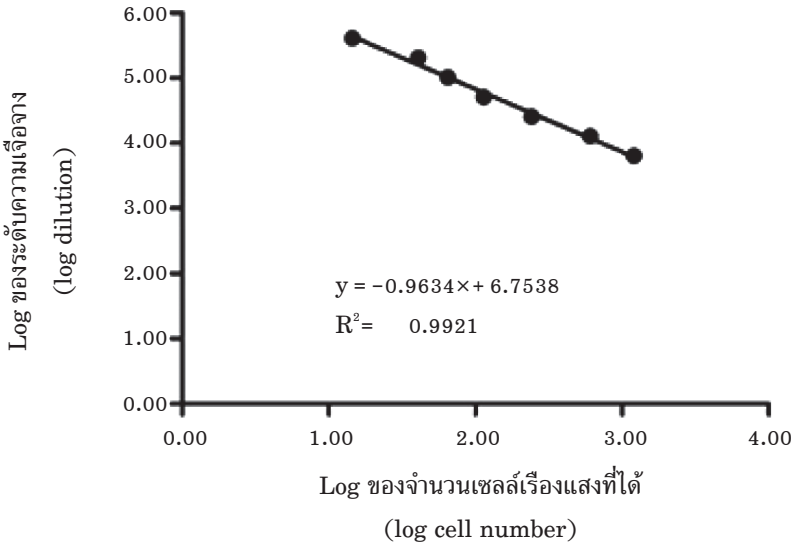

**ภาพที่ 3** เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ที่ติดเชื้อ HPV-16 pseudovirion เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่ระดับความเจือจางของ HPV-16 pseudovirion 1/1,600 และ 1/409,600 เมื่อพิจารณาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนต์ fluorescence (ภาพ A-1 และ B-1) และแบบ brightfield (A-2 และ B-2) ที่กำลังขยายเลนส์วัตถุ 5X

**การหาค่าไตเตอร์ของ HPV-16 pseudovirion และการเจือจางที่เหมาะสมของ pseudovirion ที่ผลิตได้เพื่อนำไปใช้ทดสอบ PBNA**

จำนวนเซลล์ 293FT เรืองแสงเมื่อติดเชื้อ HPV-16 pseudovirion สามารถทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ELISPOT ดังแสดงในภาพที่ 4 และผลการนับจำนวนเซลล์เรืองแสง ดังแสดงในตารางที่ 1 สามารถนำมาคำนวณหาค่าไตเตอร์ได้จากสมการเส้นตรง ดังแสดงในภาพที่ 5 พบว่า HPV-16 pseudovirion ที่ผลิตได้มีค่าไตเตอร์ [log300 เซลล์]/0.1 มิลลิลิตร เท่ากับ 4.37 มีค่าการเจือจาง (dilution fold)/0.1 มิลลิลิตร คือ 1/23,542 เท่า โดยสามารถเจือจาง pseudovirion ที่ผลิตได้เพื่อนำไปใช้ทดสอบ PBNA เท่ากับ 1/11,771 เท่า ในขณะที่คำนวณค่าไตเตอร์ด้วยวิธี Reed-Muench ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่ามีค่าไตเตอร์ log$TCID_{50}$/0.1 มิลลิลิตร เท่ากับ 6.67 มีค่าการเจือจาง (dilution fold)/1.0 มิลลิลิตร คือ 1/46,340,950 เท่า และเมื่อรายงานค่าเจือจางตามวิธีการคำนวณของ NIFDC จะมีค่าเท่ากับ 1/11,585 เท่า




**ภาพที่ 4** เพลทที่มีเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT เรืองแสงเมื่อติดเชื้อ HPV-16 pseudovirion ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เจือจางแบบ 2 เท่า จำนวน 20 ค่า ตั้งแต่ 1/200 ถึง 1/104,857,600 บ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อทำการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ด้วยเครื่อง ELISPOT โดยเพลทที่ 1 คอลัมน์ที่ 2-11 แสดงเซลล์เรืองแสงที่ค่าความเจือจางตั้งแต่ 1/200 ถึง 1/102,400 ตามลำดับ และเพลทที่ 2 คอลัมน์ที่ 2-11 แสดงเซลล์เรืองแสงที่ค่าความเจือจางตั้งแต่ 1/204,800 ถึง 1/104,857,600 ตามลำดับ แถว B-G ของเพลทที่ 1 และ 2 เป็นการทำ 6 ซ้ำ ของแต่ละความเจือจาง, คอลัมน์ที่ 1 และ 12 และแถว A และ H ไม่มีเซลล์เพาะเลี้ยง




**ภาพที่ 5** ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างค่า log ของจำนวนเซลล์เรืองแสงที่ได้ (log cell number) กับค่า log ของระดับความเจือจาง (log dilution) ของ HPV-16 pseudovirion ที่ผลิตได้จากตารางที่ 1 และการหาค่าการเจือจางสำหรับการทดสอบ PBNA
สมการความสัมพันธ์ y=−0.9634×+6.7583 ที่ $R^2$ = 0.9921 กำหนดให้แทนค่า X ด้วย 2.477121 (= log300) และค่า y คือ log dilution ใช้ในการรายงานค่าไตเตอร์

**ตารางที่ 2** การคำนวณค่า log$TCID_{50}$/0.1 มิลลิลิตร โดยวิธี Reed-Muench เพื่อหาค่าไตเตอร์ของ HPV-16 pseudovirion โดยพิจารณาจำนวนเซลล์เรืองแสงที่อ่านได้ด้วยเครื่อง ELISPOT และการหาค่าการเจือจางสำหรับการทดสอบ PBNA

| จำนวนเท่าของการเจือจาง | จำนวนเท่าของการเจือจาง (log) | จำนวนหลุมที่แสดงผล | | ผลรวมสะสม | | SP+SN | SP/(SP+SN) | หมายเหตุ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 819,200 | 5.91 | 6 | 0 | 18 | 0 | 18 | 1 | |
| 163,844 | 621 | 6 | 0 | 12 | 0 | 12 | 1 | |
| 3,276,800 | 6.52 | 4 | 2 | 6 | 2 | 8 | 0.750 | Upper 0.5 |
| 6,553,600 | 6.82 | 2 | 4 | 2 | 6 | 8 | 0.250 | Lower 0.5 |
| 13,107,200 | 7.12 | 0 | 6 | 0 | 12 | 12 | 0.000 | |
| 26,214,400 | 7.42 | 0 | 6 | 0 | 18 | 18 | 0.000 | |

หมายเหตุ: SP คือ ผลรวมสะสมของหลุมที่ให้ค่าเป็นบวก โดยคิดสะสมจากค่าการเจือจางที่มากที่สุด (ล่างขึ้นบน)
SN คือ ผลรวมสะสมของหลุมที่ให้ค่าเป็นลบ โดยคิดสะสมจากค่าการเจือจางที่น้อยที่สุด (บนลงล่าง)

## วิจารณ์

การผลิตและการหาค่าไตเตอร์ของ HPV-16 pseudovirion พบว่าหลังการเหนี่ยวนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงด้วย lipofectamine สามารถตรวจติดตามการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ของโปรตีน eGFP ภายในเซลล์ได้ จากการทดสอบเพิ่มเติมพบว่าเมื่อวิเคราะห์เซลล์หลังการเหนี่ยวนำพลาสมิด 48 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง flow cytometer พบเซลล์มากกว่า 80% มีการเรืองแสง eGFP เมื่อเทียบกับเซลล์ 293FT ที่ไม่มีการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนต์ นอกจากนี้พบว่าการเหนี่ยวนำพลาสมิดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ผล

จำนวนเซลล์เพาะเลี้ยงมีความหนาแน่นที่ประมาณ 60-70% ในขณะที่เวลา 72 ชั่วโมง เซลล์เพาะเลี้ยงมีความหนาแน่นมากกว่า 99% และเริ่มมีเซลล์ที่หลุดลอยจากพื้นผิวภาชนะ แสดงให้เห็นว่าเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการผลิต HPV-16 pseudovirion คือ 48 ชั่วโมง เนื่องจากจำนวนเซลล์ในภาชนะเลี้ยงเซลล์มีความหนาแน่นที่เหมาะสม คือ ประมาณ 80-90% ตามที่ได้รับการถ่ายทอดวิธีการจาก NIFDC

เมื่อนำ HPV-16 pseudovirion ที่ผลิตได้บ่มกับเซลล์เพาะเลี้ยง 293FT โดยไม่มีการเติม lipofectamine พบว่า HPV-16 pseudovirion สามารถทำให้เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT เรืองแสงได้ แสดงให้เห็นว่ากระบวนการเหนี่ยวนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงทำให้ได้ HPV-16 pseudovirion ที่มี infectivity และสามารถห่อหุ้ม reporter plasmid ที่มียีนของโปรตีนเรืองแสง eGFP เข้าสู่เซลล์ได้ ผลที่ได้เป็นไปตามที่ได้รับการถ่ายทอดวิธีจาก NIFDC และตามรายงานของ Buck CB และคณะ[13-15]

เซลล์เรืองแสงสามารถมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนต์ แต่การนับจำนวนเซลล์เรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนต์มีโอกาสเกิดความผิดพลาดได้มาก เนื่องจากความเข้มของสารเรืองแสงในแต่ละเซลล์มีค่าที่แตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 2 และกล้องไม่สามารถตั้งค่า cut off ของความเข้มของแสง (intensity) ของโปรตีน eGFP ที่แสดงออกภายในเซลล์ได้ ขณะที่การนับเซลล์เรืองแสงจากเครื่อง ELISPOT ด้วยโปรแกรม ImmunoSpot 7.0.23.2 สามารถตั้งค่าปัจจัยที่มีผลต่อการนับจำนวนของเซลล์เรืองแสงให้เป็นหลักเกณฑ์เดียวกันในทุกการทดสอบได้[10-12] ซึ่งจะมีผลต่อการคำนวณค่าไตเตอร์ของ pseudovirion ที่ผลิตต่อไปได้ สำหรับการพิจารณาเซลล์เรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนต์ สามารถนำมาคำนวณหาค่าไตเตอร์ด้วยวิธี Reed-Muench แต่ไม่สามารถนำมาคำนวณโดยใช้สมการเส้นตรงเหมือนข้อมูลที่ได้จากเครื่อง ELISPOT เพราะไม่สามารถนับจำนวนเซลล์เรืองแสงในแต่ละความเจือจาง โดยเฉพาะหลุมที่มีปริมาณเซลล์เรืองแสงจำนวนมาก ดังแสดงในภาพที่ 2A พบว่าค่าไตเตอร์ $logTCID_{50}$/0.1 มิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 7.8 และให้ค่าเจือจางเพื่อนำไปใช้ทดสอบ PBNA คือ 1/168,632 เท่า (ข้อมูลไม่ได้เผยแพร่) ในขณะที่การหาค่าไตเตอร์ด้วยวิธี Reed-Muench ผ่านการวิเคราะห์จากเครื่อง ELISPOT มีค่าไตเตอร์ $logTCID_{50}$/0.1 มิลลิลิตร เท่ากับ 6.67 ซึ่งค่าเจือจางที่คำนวณได้ คือ 1/11,585 เท่า ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันประมาณ 15 เท่า ผลจากเครื่อง ELISPOT เมื่อนำมาหาค่าเจือจางสำหรับทดสอบ PBNA ด้วยวิธี Reed-Muench หรือการใช้สมการเส้นตรง พบว่าได้ค่าที่ใกล้เคียงกัน คือ 1/11,585 เท่า และ 1/11,771 เท่า ตามลำดับ แสดงว่าการนับจำนวนเซลล์โดยโปรแกรมของเครื่อง ELISPOT แม่นยำมากกว่าการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนต์ และเป็นไปตามคำแนะนำของ NIFDC ดังนั้นในเบื้องต้นจึงนำวิธีการศึกษานี้มาใช้ผลิต HPV-pseudovirion สายพันธุ์ 18 เพิ่มเติม ซึ่งเป็น HPV สายพันธุ์ที่อยู่ในวัคซีนป้องกัน HPV แบบ 2 สายพันธุ์ พบว่าสามารถผลิต pseudovirion ที่มี infectivity ได้เช่นกัน (ข้อมูลไม่ได้เผยแพร่)

ปัจจุบันยังไม่มีตัวอย่าง neutralizing antibody จากการศึกษาทางคลินิกสำหรับนำมาทดสอบร่วมกับ HPV-16 pseudovirion ที่ผลิตขึ้น แต่ได้มีการทดสอบกับแอนติบอดีมาตรฐาน (anti-human papilomavirus type 16 serum (NIBSC 05/134) และแอนติบอดีต่อ HPV-16 จากสัตว์ทดลองที่ได้รับวัคซีน HPV สายพันธุ์ 16 (in-house) ตามวิธีจาก NIFDC พบว่า HPV-16 pseudovirion จับกับแอนติบอดีดังกล่าวทำให้เกิด neutralization ได้ (อยู่ระหว่างการเผยแพร่) นอกจากนี้วิธีการผลิต HPV-pseudovirion ได้ถ่ายทอดให้กับผู้ผลิตวัคซีนในประเทศและนักวิจัย เพื่อใช้ในการศึกษาพัฒนาวัคซีนป้องกันมะเร็งปากมดลูก สำหรับใช้ในประเทศไทย ตามโครงการถ่ายทอดองค์ความรู้ด้านการควบคุมคุณภาพวัคซีนป้องกันมะเร็งปากมดลูกด้วยวิธี pseudovirion-based neutralization assay (PBNA) เมื่อปี พ.ศ. 2563 โดยอนาคตหากมีการศึกษาวัคซีนป้องกันมะเร็งปากมดลูกทางคลินิก องค์ความรู้ที่ได้จากต้นแบบการผลิต HPV-16 pseudovirion นี้จะถูกนำมาพัฒนาต่อยอดเพื่อผลิต HPV-psuedovirion

สายพันธุ์อื่นและนำมาใช้ตรวจสอบ protective titer ของผู้ได้รับวัคซีนป้องกันมะเร็งปากมดลูกต่อไปได้

## สรุป

HPV-16 pseudovirion ที่ผลิตได้ตามวิธีที่ได้รับการถ่ายทอดจากหน่วยงานควบคุมกำกับภาครัฐด้านวัคซีนของสาธารณรัฐประชาชนจีน (NIFDC) มีคุณสมบัติทำให้เซลล์เพาะเลี้ยง 293FT ติดเชื้อได้โดยมีไตเตอร์ที่สามารถนำมาคำนวณเป็นค่าความเจือจางเพื่อนำไปใช้ทดสอบ PBNA วิธีการผลิตนี้สามารถใช้เป็นต้นแบบในการผลิต pseudovirion ของ HPV สายพันธุ์อื่น ตลอดจนถ่ายทอดองค์ความรู้วิธีการให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องได้ต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สถาบันวัคซีนแห่งชาติ ที่สนับสนุนเงินทุนในโครงการเสริมสร้างศักยภาพของห้องปฏิบัติการในการเตรียม pseudovirions สถาบันชีววิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการเพิ่มจำนวนพลาสมิดและตรวจวิเคราะห์ความถูกต้องของพลาสมิดที่ใช้ในงานวิจัย ภายใต้โครงการวิจัยเพิ่มศักยภาพและการสนับสนุนอุตสาหกรรมการแพทย์ครบวงจรและวัคซีน และ Dr. Jianhui Nie จาก Division of HIV/AIDS and Sex-transmitted Virus Vaccines, NIFDC สาธารณรัฐประชาชนจีน ที่อนุเคราะห์ Reporter plasmid (eGFP) รวมทั้งการถ่ายทอดวิธีการผลิต HPV-pseudovirion และให้คำปรึกษาจนงานวิจัยนี้สำเร็จด้วยดี

## เอกสารอ้างอิง

1. Zhang X, Li S, Modis Y, Li Z, Zhang J, Xia N, et al. Functional assessment and structural basis of antibody binding to human papillomavirus capsid. Rev Med Virol 2016; 26(2): 115-28.
2. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. Clin Microbiol Rev 2003; 16(1): 1-17.
3. Egawa N, Doorbar J. The low-risk papillomaviruses. Virus Res 2017; 231: 119-27.
4. Brisson M, Kim JJ, Canfell K, Drolet M, Gingras G, Burger EA, et al. Impact of HPV vaccination and cervical screening on cervical cancer elimination: a comparative modelling analysis in 78 low-income and lower-middle-income countries. Lancet 2020; 395(10224): 575-90.
5. Wang JW, Roden RB. Virus-like particles for the prevention of human papillomavirus-associated malignancies. Expert Rev Vaccines 2013; 12(2): 129-41.
6. Yang DY, Bracken K. Update on the new 9-valent vaccine for human papillomavirus prevention. Can Fam Physician 2016; 62(5): 399-402.
7. Ma B, Roden RB, Hung CF, Wu TC. HPV pseudovirions as DNA delivery vehicles. Ther Deliv 2011; 2(4): 427-30.
8. Biryukov J, Meyers C. Papillomavirus infectious pathways: a comparison of systems. Viruses 2015; 7(8): 4303-25.
9. Tsang SH, Basu P, Bender N, Herrero R, Kemp TJ, Kreimer AR, et al. Evaluation of serological assays to monitor antibody responses to single-dose HPV vaccines. Vaccine 2020; 38(38): 5997-6006.
10. Nie J, Liu Y, Huang W, Wang Y. Development of a triple-color pseudovirion-based assay to detect neutralizing antibodies against human papillomavirus. Viruses 2016; 8(4): 107. (12 pages).
11. Sehr P, Rubio I, Seitz H, Putzker K, Ribeiro-Müller L, Pawlita M, et al. High-throughput pseudovirion-based neutralization assay for analysis of natural and vaccine-induced antibodies against human papillomaviruses. PLoS One 2013; 8(10): e75677. (11 pages).
12. Nie J, Huang W, Wu X, Wang Y. Optimization and validation of a high throughput method for detecting neutralizing antibodies against human papillomavirus (HPV) based on pseudovirons. J Med Virol 2014; 86(9): 1542-55.

13. Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT. Generation of HPV pseudovirions using transfection and their use in neutralization assays. Methods Mol Med 2005; 119: 445-62.
14. Buck CB, Thompson CD, Pang YY, Lowy DR, Schiller JT. Maturation of papillomavirus capsids. J Virol 2005; 79(5): 2839-46.
15. Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT. Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. J Virol 2004; 78(2): 751-7.
16. Prachasuphap A, Jongpitisub K, Saengtong N, Treeyoung P, Chaiya P, Dhepakson P. Cloning and expression of human monoclonal antibody with potent binding to 2019 novel coronavirus. Bull Dept Med Sci 2020; 62(3): 155-66.

# The Production of HPV Type 16 Pseudovirion for the Development of Pseudovirion-Based Neutralization Assay (PBNA)

**Wipawee Wongchana[1], Sakalin Trisiriwanic[1], and Supaporn Phumiamorn[2]**

[1] *Institute of Biological Products, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand*

[2] *Medical Sciences Technical Office, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand*

**ABSTRACT** Human papillomavirus (HPV) is implicated in the majority of cervical cancer cases, which vaccination being a crucial method for preventing infection. The pseudovirion-based neutralization assay (PBNA) has been employed to determine the neutralizing antibody levels in HPV-vaccine immunized recipients. This article introduced the product of HPV-pseudovirion serotype 16 (HPV-16 pseudovirion), a technique transferred from the protocol established by the National Institutes for Food and Drug Control (NIFDC), China. Results following the transfection of p16sheLL and pcDNA3.1 eGFP plasmids into 293FT cell lines showed the production of pseudovirion containing the eGFP protein within 48 hours, with infectivity observed on the 293FT cell line. Fluoresced cells were counted using ELIPOT. The calculated pseudovirion titer, based on 300 eGPF-positive cells per 0.1 milliliter, was 4.37, with a dilution factor of 11,771 for PBNA. Additionally, the pseudovirion titer examined through $TCID_{50}$ per 0.1 milliliter was 6.67, with a dilution factor of 11,585 for PBNA. Overall, the adopted method successfully produced HPV-16 pseudovirion, serving as a prototype for producing other HPV-pseudovirion serotypes and facilitating their transfer to relevant agencies to support the HPV vaccination campaign

**Keywords:** HPV-16 pseudovirion production, Plasmid transfection, Pseudovirion-based neutralization assay (PBNA)